

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologie



**Bc. Michaela Zázvorková**

Vliv typu habitatu a dlouhodobé *in vitro* kultivace na fotosyntetické charakteristiky  
sněžných řas a jejich odolnost vůči stresu indukovanému UV zářením

Impact of habitat type and long-term *in vitro* cultivation on photosynthetic  
characteristics of snow algae and their resistance to stress induced by UV radiation

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Linda Nedbalová, Ph.D.

Praha, 2019



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28. 4. 2019

Podpis

Ráda bych poděkovala všem, kdo významně přispěli k tomu, že tato práce vznikla a že se jí povedlo dotáhnout do konce.

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce doc. RNDr. Lindě Nedbalové, Ph.D. za vedení mé práce, odborné rady a trpělivost.

Dále mé díky patří RNDr. Martině Pichrtové, Ph.D., neb právě ona mě naučila nejen jak PAM fluorometr použít, ale také si dala tu práci a prošla se mnou všemi protokoly, aby mě přiměla jim porozumět. Dík patří taktéž paní Janě Vokurkové, která mě provedla laboratorními lapáliemi.

Poděkování dlužím i Mgr. Janě Duchoslavové, jež mi pomohla se statistickým vyhodnocováním dat a stejně tak můj dík patří Bc. Máje Škvorové a Bc. Martinu Zázvorkovi, neb ti oba si na mě udělali čas a prošli se mnou všechna čísla, která se přede mnou pokusila utéct.

Za korekci anglických přešlapů bych ráda poděkovala Bc. Samanthě Coker.

A za velké podržení nad vodou a neustálý přísun optimismu a podpory bych chtěla poděkovat Mgr. Danielovi Kolaříkovi, protože bez něj bych to nejspíš nikdy nedopsala.

Děkuji všem, co mě v průběhu tvorby této práce nezatratili – mé rodině obzvlášť. A děkuji i Mie a Auroře za milou společnost v průběhu tvorby následujících stránek.

## Abstrakt

Sněžné řasy jsou psychrofilní mikroorganismy, které obývají sněhová pole v horských a polárních oblastech a za příznivých podmínek tvoří tzv. barevné sněhy. Většina druhů patří do řádu Chlamydomonadales (Chlorophyta) s komplikovaným životním cyklem, zahrnujícím bičíkovce i nepohyblivá stádia (cysty). Extrémní prostředí sněhu je charakteristické nízkou teplotou, problémy s dostupností tekuté vody a nedostatkem živin. V závislosti na lokalitě a fázi životního cyklu se navíc sněžné řasy musí vypořádat s nadbytkem či naopak nedostatkem slunečního záření, jehož významnou složkou je i nebezpečné UV záření. Právě světelné podmínky se značně liší na exponovaných lokalitách nad hranicí lesa či v polárních oblastech a v lesních habitatech.

V první části této práce jsem porovnávala reakce fotosyntetického aparátu kmenů sněžných řas z lesních a bezlesých habitatů na různé intenzity záření, a dále jsem se zabývala posouzením případné změny souvisejících s dlouhodobou kultivací v laboratoři. Na základě měření „rychlých“ světelných křivek na PAM fluorometru jsem stanovila některé charakteristiky fotosyntetického aparátu jednotlivých kmenů, (parametry  $\alpha$  a  $I_k$ ), které vypovídají o adaptaci na nízké či vysoké intenzity světla. Pro část kmenů bylo možné provést srovnání výsledků získaných v tříletém odstupu. V druhé části práce jsem srovnávala reakce řas z lesních habitatů a bezlesí na UV-A záření. Tento experiment byl založen na stanovení maximálního kvantového výtěžku fotosystému II pomocí PAM fluorometrie, který je dobrým indikátorem funkčnosti fotosyntetického aparátu. Měření probíhala před zahájením experimentu, po 24 hodinách expozice UV-A záření a 24 hodin po rekonvalescenci.

Z výsledků je patrné, že fotosyntetické charakteristiky studovaných kmenů navzdory dlouhodobé laboratorní kultivaci odrážejí typ původního habitatu. Experimenty potvrdily rozdíly mezi reakcemi řas z bezlesých a lesních habitatů, kdy kmeny ze zastíněných stanovišť měly efektivnější fotosystém II při nižších intenzitách záření a současně u nich dříve došlo k saturaci fotosystému ve srovnání s kmeny z bezlesí. Porovnání měření v odstupu tří let neprokázalo signifikantní posun sledovaných parametrů. Expozice kmenů UV-A záření způsobila výrazný pokles maximálního kvantového výtěžku u kmenů z obou habitatů, nicméně ani v jednom případě nedošlo k nevratným změnám. Řasy z bezlesí byly dle předpokladu odolnější vůči UV-A záření.

## Klíčová slova:

sněžné řasy, dlouhodobá kultivace, srovnání habitatů, PAM fluorometrie, „rychlé“ světelné křivky, intenzita záření, UV-A záření

## **Abstract**

Snow algae are psychrophilic microorganisms, that inhabit snow fields in mountains and polar regions, which creates colored snow in good conditions. Most species belong to order Chlamydomonadales (Chlorophyta) with complicated life cycles, containing flagellates and immobile stages (cysts). Extreme environment of snow is characterized by low temperature, problems with availability of water and lack of nutrition. Depending on location and phase of life cycle, snow algae have to deal with excess or lack of solar radiation, the important component of which is also dangerous UV radiation. The light conditions differ substantially from open location above the forest level or polar regions to forest habitats.

In the first part of this work I compared reactions of photosynthetic apparatus of snow algae strains from forest and forestless habitats to different intensity of radiation, then I dealt with assessing any changes related to long-term cultivation in laboratory. Based on measurement of rapid light curves on PAM fluorometer I have determined some characteristics of photosynthetic apparatus of individual strains (parameters  $\alpha$  and  $I_k$ ), which indicate adaptation to low or high light intensity. For some strains, it was possible to compare the results obtained at a three-year interval. In the second part of the thesis I compared the reactions of algae from forest and open habitats to UV-A radiation. This experiment was based on the determination of the maximum quantum yield of photosystem II by PAM fluorometry, which is a good indicator of the photosynthetic function. Measurements were taken before the start of the experiment, after 24 hours of UV-A exposure and 24 hours after recovery.

The results show that the photosynthetic characteristics of the studied strains, despite long-term laboratory cultivation, reflect the characteristic of the original habitat. The experiments confirmed the differences between algae responses from open and forest habitats, with strains from shaded habitats having a more effective photosystem II at lower radiation intensities and at the same time having previously saturated the photosystem compared to strains from exposed habitat. Comparison of measurements in the interval of three years did not show significant shift of the monitored parameters. Exposure to UV-A radiation caused a significant decrease in the maximum quantum yield for both habitat strains, but there were no irreversible changes in either case. Algae from open habitats were more resistant to UV-A radiation, as we assumed.

## **Keywords:**

snow algae, long-term cultivation, comparison of habitats, PAM fluorometry, rapid light curves, light intensity, UV-A radiation

## Seznam zkratek:

- ETR – Electron transport rate – Rychlost elektronového transportu
- $F_0$  – Basic fluorescence – Základní fluorescence
- $F_0'$  – Minimum quantum yield of chlorophyll in adaptation to light – Minimální výtěžek fluorescence chlorofylu při adaptaci na světlo
- FAR – Photosynthetically active radiation – Fotosynteticky aktivní záření
- $F_M$  – Maximal fluorescence in adaptation to dark – Maximální fluorescence při adaptaci na tmu
- $F_M'$  – Maximal fluorescence in adaptation to light – Maximální fluorescence při adaptaci na světlo
- $F_s$  – Fluorescence intensity in steady state – Intenzita fluorescence v ustáleném stavu
- $F_V$  – Variable fluorescence – Variabilní fluorescence
- $F_V/F_M$  – Maximum quantum yield – Maximální kvantový výtěžek
- MAAs – Mycosporine-like amino acids – Mykosporinové aminokyseliny
- IR – Infrared – infračervené záření
- PSII – Photosystem II – Fotosystém II
- rETR – Relative electron transport rate – Relativní rychlost elektronového transportu
- RLC – Rapid light curves – „rychlé“ světelné křivky
- ROS – Reactive oxygen species – Reaktivní forma kyslíku
- UV – Ultraviolet radiation – Ultrafialové záření
- UV-A – Ultraviolet radiation A – Ultrafialové záření A
- UV-B – Ultraviolet radiation B – Ultrafialové záření B
- UV-C – Ultraviolet radiation C – Ultrafialové záření C

## Obsah:

Abstrakt .....	V
Klíčová slova: .....	V
Abstract .....	VI
Keywords: .....	VI
Seznam zkratk: .....	VII
Obsah: .....	VIII
1 Úvod .....	1
2 Literární přehled .....	2
2.1 Sníh jako habitat .....	2
2.2 Světlo – zdroj energie pro fotosyntézu i stresový faktor .....	4
2.3 Fotoinhibice .....	6
2.4 Ekologie a diverzita sněžných řas .....	7
2.5 Měření fotosyntetických charakteristik sněžných řas .....	10
2.5.1 Světelné křivky .....	11
2.5.2 Maximální kvantový výtěžek .....	12
3 Cíle a hypotézy .....	15
4 Metodika .....	16
4.1 Kultivační média .....	16
4.1.1 BBM .....	16
4.1.2 3N BBM .....	17
4.1.3 BBM + Soil .....	17
4.2 Kmeny sněžných řas .....	17
4.3 Kultivace .....	20
4.3.1 Inkubátor .....	20
4.3.2 Mikroskop .....	20
4.4 Měření světelných křivek .....	20
4.4.1 Protokol na měření „rychlých“ světelných křivek .....	21
4.4.2 Výpočet rETR a parametrů RLC .....	22
4.5 Měření stresových reakcí při ozáření UV-A .....	22
4.5.1 Protokol na měření maximálního kvantového výtěžku sněžných řas .....	23
4.6 Statistické metody .....	24
5 Výsledky .....	25
5.1 „Rychlé“ světelné křivky .....	25
5.2 Statistické vyhodnocení hodnot $I_k$ a $\alpha$ .....	32
5.3 Srovnání vlivu UV záření u jednotlivých kmenů .....	34
5.4 Statistické vyhodnocení vlivu habitatu na odolnost vůči UV-A a následnou rekonvalescenci .....	37
6 Diskuze .....	39



6.1	Reakce fotosyntetické aktivity sněžných řas na různé intenzity FAR .....	39
6.1.1	Intenzita FAR v přirozených podmínkách a během laboratorního experimentu ....	39
6.1.2	Vliv původního habitatu na fotosyntetické charakteristiky řas .....	41
6.1.3	Stabilita fenotypu v rámci dlouhodobé kultivace.....	42
6.2	Vliv UV-A záření na stresovou reakci kmenů .....	43
6.2.1	Toxicita UV záření a ochranné mechanismy .....	43
6.2.2	Intenzita UV záření .....	45
6.2.3	Změny $F_v/F_m$ v závislosti na expozici UV záření, životním stádiu a délce laboratorní kultivace.....	46
7	Závěr.....	49
8	Literární zdroje .....	50

# 1 Úvod

Sněžné řasy jsou polyfyletickou skupinou extremofilních fotosyntetických mikroorganismů z třídy *Chlorophyceae*, žijící ve sněhové pokrývce. Znamé jsou zejména pro okem viditelné barevné skvrny na sněžných polích, tzv. barevné sněhy (Leya, 2013).

Poprvé byly barevné sněhy řasy zaznamenány už v dobách Aristotela, byť tehdy se ještě nevědělo, že se jedná o organismy (Clarke, 1875). Dodnes jsou právě díky své barevnosti a s tím spojenými pigmenty předmětem zájmu vědců i široké veřejnosti. Ne všechny sněžné řasy však tvoří pestře barevné červené sněhy jako třeba *Chlamydomonas nivalis*. Část sněžných řas barví sníh do zelena, žluta či oranžova anebo zabarvení ve sněhové pokrývce nemusí být vůbec patrné (Remias et al., 2005).

Mezi fotosyntetizující, sníh obývající organismy patří především zelené řasy z tříd *Chlorophyceae* a *Trebouxiophyceae*, které způsobují barevné sněhy nejčasteji (Komárek and Nedbalová, 2007). Ve sněhu však můžeme najít i zástupce jiných taxonomických skupin, jako například eukaryotické obrněnky (*Dinophyta*), skryténky (*Cryptophyta*), zlativky (*Chrysophyceae*), rozsivky (*Bacillariophyceae*), různobrvky (*Xanthophyceae*) a prokaryotické sinice (*Cyanobacteria*) (Hoham and Duval, 2001). Tato práce se zabývá především nejdůležitější skupinou sněžných řas, kterou jsou zelené řasy z rodů *Chlamydomonas* (*Ch.*) a *Chloromonas* (*Cr.*), které patří do řádu *Chlamydomonadales*.

Sněžné řasy obývají polární a horské oblasti, kde čelí problémům s nedostatkem tekuté vody, nízkou koncentrací živin a extrémními světelnými podmínkami. Právě vysoká intenzita slunečního záření, případně silně kolísající míra ozáření v závislosti na počasí, denní době a hloubce pod povrchem je jedním ze stresujících faktorů v prostředí sněhu (Gorton et al., 2001). Sluneční záření je nezbytné pro fotosyntézu, která není schopná účinně probíhat při nízké intenzitě záření. Současně však při určité míře záření dochází k saturaci a následné inhibici fotosystému. Tomuto jevu se říká fotoinhibice a vede ke zpomalení až zastavení fotosyntézy (Aro et al., 1993). Taktéž se sněžné řasy musí chránit i před nadbytkem ultrafialového (UV) záření, přičemž s vyšší nadmořskou výškou může jeho intenzita vzrůst až o 30 % oproti hodnotám v nížinách (Blumthaler et al., 1994).

Problém s nadbytkem světla mohou řasy řešit v zásadě dvěma způsoby. Za prvé tvorbou pohyblivých stádií umožňující migraci sněhem, za druhé tvorbou ochranných pigmentů (Laybourn-Parry et al., 2012). Typickou lokalitou sněžných řas jsou exponovaná sněhová pole v bezlesých horských a polárních oblastech. Pro tyto oblasti jsou charakteristické velmi

extrémní světelné podmínky. Nicméně sněžné řasy se vyskytují i v lesnatých, a tedy zastíněných oblastech, kde je intenzita slunečního záření výrazně nižší. Jedním z druhů sněžných řas nalezených na lesních lokalitách je například *Cr. brevispina* (v Krkonoších často pod 1000 m n. m., (Nedbalová et al., 2008)) nebo *Cr. chenangoensis* a *tughillensis* (Hoham et al., 2006). Je tedy zřejmé, že sněžné řasy nejsou ekologicky homogenní skupinou. Dosud však máme k dispozici jen omezené množství dat týkajících se ekofyziologických charakteristik sněžných řas a srovnání druhů z různých habitatů zcela chybí.

Jedním z cílů této práce proto bylo porovnat reakce vybraných laboratorních kmenů pocházejících z bezlesí a lesních habitatů na různé intenzity záření. Měření probíhalo na kmenech dlouhodobě kultivovaných ve sbírkách. Otázkou tedy je, zda si v podmínkách *in vitro* zachovávají „otisk“ svého původního prostředí. Díky dříve naměřeným datům bylo možné také ověřit, zda kmeny nemění své fotosyntetické charakteristiky v časovém horizontu tří let. Ve druhé části práce jsem se zaměřila na porovnání stresové reakce indukované ultrafialovým zářením A (UV-A) u stejného souboru kmenů.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Sníh jako habitat

Sníh je specifická forma pevného skupenství vody tvořená ze sněhových vloček. Ty vznikají již v atmosféře v mracích kolem kondenzačních jader složených nejčastěji z mořské soli, jílů či mikrobů a následně se formou sněžení dostanou až na zem (Laybourn-Parry et al., 2012). V ekosystémech je sníh významný jako zdroj sladké vody v době tání a přes zimu jako kvalitní tepelný izolant. Sněhová pokrývka je značně porézní a obsahuje tedy velký objem vzduchu. Tím pádem má vysokou izolační schopnost. Toho využívají jak mikroorganismy, tak živočichové hledající útočiště před nízkými teplotami a větrem. Míra izolace záleží jak na síle vrstvy, tak na typu sněhu. Takzvaný suchý sníh s nízkým obsahem vody umožňuje vyšší proudění vzduchu, a tudíž izoluje méně než sníh mokrá. To je mimo jiné způsobeno i tím, že voda má vyšší měrnou tepelnou kapacitu než sníh (Palm and Tveitereid, 1979). Izolační vlastnosti sněhu uvnitř pokrývky mohou způsobovat velké teplotní gradienty, které jsou schopné restrukturalizovat složení sněhu (Colbeck, 1983).

Sníh je obecně chudý na živiny. Čerstvě napadaný sníh obsahuje jen ty živiny, které se na sněhové částice nabalí před dopadem na zem v atmosféře. Hlavní obsah mimo vody pak tvoří aerosoly, spory, pyly a antropogenní znečištění, mezi další příměsi pak patří ionty  $\text{PO}_4^{3-}$ ,

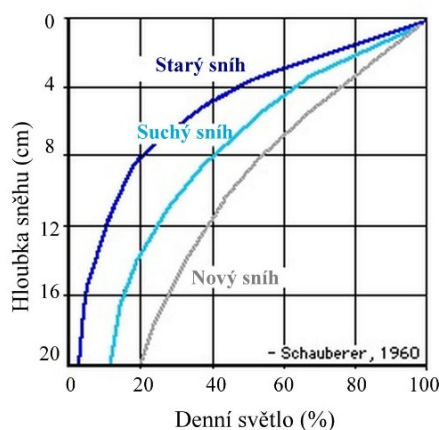
$\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$ . Přísun veškerých látek do sněhové pokrývky je závislý především na srážkách a větru přinášejícím prachové částice (Laybourn-Parry et al., 2012), (Jones, 1991). Izolační vlastnosti sněhu i množství živin záleží také na poloze sněhu v profilu. Zatímco horní část sněhové pokrývky interaguje s atmosférou i okolním sněhem, střední vrstva reaguje už jen s okolním sněhem a případnou tající vodou. Nejhlubší vrstvy jsou od atmosféry izolovány úplně, ty jsou však zase v kontaktu s povrchem půdy (Dove et al., 2012).

Další významnou vlastností sněhu je vysoké albedo. Albedo určuje množství slunečního záření pronikajícího do sněhové pokrývky. Zpravidla platí, že čím čistší je sníh, tím je odrazivost vyšší. Nově napadaný sníh má o 10 % vyšší albedo než starší, byť stále neznečištěný sníh, což je způsobeno nejen čistotou, ale také strukturou. Albedo čerstvého sněhu se pohybuje mezi 80–90 % pro UV záření i fotosynteticky aktivní záření (dále FAR), přičemž platí, že s rostoucí vlnovou délkou se odrazivost snižuje (Wiscombe and Warren, 1980).

Příčinou snížení odrazivosti u staršího sněhu je změna struktury sněhových zrn – zmenšují se póry a zvyšuje se velikost zrn. Právě malá velikost zrn je pro odrazivost stěžejní. Přítomnost větších sněhových zrn snižuje albedo, protože vzdálenost a doba přenosu světla je větší u větších sněhových zrn (Wiscombe and Warren, 1980). Odrazivost sněhu také snižuje prach, sněžné řasy a tvorba kryokonitů. Tyto prvky mohou albedo snížit až o 50 % (Kohshima et al., 1994).

Průnik světla do sněhové pokrývky je tedy ovlivněn jak kvalitou sněhu (Obr. 1) tak energií fotonů. Přestože krátkovlnné záření, včetně UV, projde do větší hloubky než dlouhovlnné, je většina světelné energie krátkovlnných fotonů absorbována převážně v horních 30 cm (Pomeroy and Brun, 2001).

Právě heterogenity světelných podmínek ve sněhové pokrývce využívají sněžné řasy s pohyblivými stádii, které jsou schopné migrovat do různých vrstev podle intenzity záření. Kvůli vysokému albedu sněhu se totiž mohou potýkat i s nedostatkem FAR. Pohyb je však podmíněn přítomností kapalné vody a tak je vegetační



*Obr. 1: Úbytek světla ve sněhové pokrývce ve vertikálním profilu (Upraveno podle: [www.oulu.fi](http://www.oulu.fi)).*

sezóna omezená na dobu jarního a letního tání a zbytek roku přecházejí ve formě různých typů cyst (Laybourn-Parry et al., 2012).

## **2.2 Světlo – zdroj energie pro fotosyntézu i stresový faktor**

Světlo je klíčovým parametrem pro život všech fototrofních organismů, a tudíž i sněžných řas. Fotoautotrofové využívají energii slunečního záření pro oxidoredukční děje, během nichž přeměňují oxid uhličitý a vodu na energeticky bohaté sloučeniny – cukry. Tento proces je velmi významný pro celkový koloběh energie na Zemi, protože většina energie, kterou živé systémy využívají, pochází přímo nebo zprostředkovaně právě ze slunečního záření.

Z fyzikálního hlediska lze světlo popsat jako elektromagnetické záření v oblasti okolo viditelného spektra. Energie jednotlivých fotonů a současně i barva světla je závislá na vlnové délce, přičemž platí, že fotony s nižší vlnovou délkou mají vyšší energii. Z hlediska energie lze světlo pocházející ze slunečního záření rozdělit do tří kategorií. Nejnižší energii má infračervené (dále jen IR) záření s vlnovou délkou mezi 760 nm a 1 mm. Toto záření není využitelné pro fotosyntézu a zpravidla se po dopadu přemění na teplo nebo odrazí. Druhou kategorií je viditelné spektrum světla s vlnovou délkou 400–760 nm. Toto záření má již dostatek energie, aby se podílelo na fotosyntéze, a je tedy zachytáváno chlorofyly a pomocnými pigmenty. Nejvyšší energii má pak ultrafialové záření s vlnovou délkou mezi 100–400 nm. Energie UV záření už dosahuje schopnosti ionizace, takže UV záření je pro živé systémy nebezpečné (Häder and Sinha, 2005). Proto si řasy vyvinuly pigmenty, které pomáhají energii UV záření snížit a přenést do reakčního centra fotosystému pro pohánění fotosyntetických reakcí. Takto jsou však řasy schopné využít pouze UV záření v oblasti spektra blízko FAR (Turnbull et al., 2013).

Sluneční záření musí být v první fázi fotosyntetizujícím organismem zachyceno, k čemuž se využívají nejrůznější světlosběrné pigmenty. Jejich koncentrace i složení závisí na taxonomickém zařazení organismu ale také na množství a kvalitě slunečního záření, které se k fotoautotrofnímu organismu, v tomto případě sněžné řase, dostane.

Například psychrofilní rozsivky žijící na spodní straně ledu využívají fukoxantin, který dobře pohlcuje vlnové délky schopné projít ledem, a přenáší jejich energii dál do reakčního centra fotosystému (Thomas and Dieckmann, 2002). Sněžné řasy akumulují často velké množství karotenoidů, typickým příkladem je *Ch. nivalis* (Remias et al., 2005). Tito

extremofilové ovšem potřebují při vysokých intenzitách slunečního záření přebytečnou energii převést na teplo, aby nedošlo k fotoinhibici a poškození fotosystémů. K tomu je vhodný například sekundární karotenoid astaxantin, který je schopný přebytečnou energii fotonů odvádět pomocí vibrace molekul a přeměnit jí tak na tepelnou energii. Tento karotenoid velice dobře absorbuje modré spektrum slunečního záření a nepropouští ho dále k chloroplastu. Nejznámější sněžnou řasou produkující tento pigment je právě *Ch. nivalis* (Gorton et al., 2001).

Obdobně jako se řasy vypořádávají s viditelným spektrem slunečního záření, tak se musí vypořádat i se UV zářením. UV záření se dále dělí do tří kategorií (UV-A, B a C) na základě vlnové délky a biologických účinků. Nejtvrdším, a tedy nejnebezpečnějším je UV-C. To je schopné výrazné penetrace do tkání živých organismů, a navíc má i ionizující účinky. Jeho vlnová délka se pohybuje pod 280 nm, nicméně je toto záření silně absorbováno plynným kyslíkem a tudíž na povrch země nedopadne (Hoham and Duval, 2001). Absorbovaná energie vede k ionizaci molekuly kyslíku, která je jednou z příčin vzniku ozonu.

UV-B záření má vlnovou délku od 280 do 315 nm a již není ionizující. Většina kosmického UV-B je absorbováno v ozonové vrstvě, na zemský povrch dopadne < 1 % z celkové energie. Stejně jako UV-C je životu nebezpečné, byť je schopné penetrovat jen několik vrstev buněk. UV-B přímo poškozuje proteiny a nukleotidy a inhibuje jak růst, tak fotosyntézu (Vincent and Roy, 1993), navíc při vysoké míře ozáření (nad 70  $\mu\text{W cm}^{-2}$ ) díky němu narůstá obsah superoxidů a malondialdehydů a kumulují se peroxidy lipidů. V reakci na to v buňkách roste aktivita superoxid dismutázy, katalázy a peroxidázy. Z toho důvodu je u sněžných řas důležitou adaptací produkce antioxidačních enzymů (Wang et al., 2009).

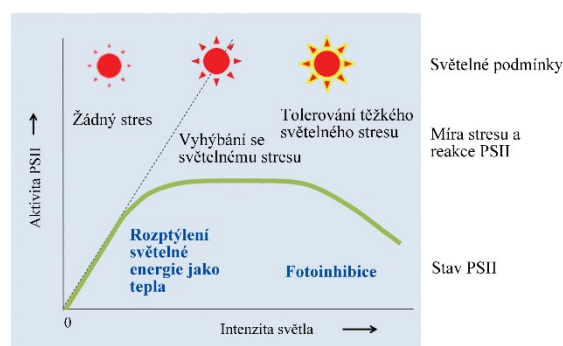
Krátkovlnné záření, které však ozonem z velké části projde a dopadne na zemský povrch, je UV-A s vlnovou délkou 315 až 400 nm. UV-A generuje v buňkách reaktivní formy kyslíku (ROS), čímž nepřímo poškozuje tuky, bílkoviny a nukleové kyseliny, což opět zvyšuje potřebu aktivity antioxidačních enzymů (Tyrrell, 1985).

Kromě produkce ochranných pigmentů se sněžné řasy (pokud jsou ve stadiu bičíkovců) mohou bránit před účinky UV záření taky přesunem do hlubších vrstev sněhové pokrývky. Rozdíl v intenzitě ozáření UV-A a UV-B mezi hloubkou 1 cm a 2 cm pod povrchem sněhové pokrývky činí zhruba 50 % původní intenzity. Společně s UV ale dochází i ke

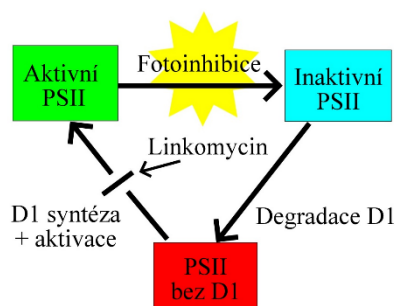
snižování intenzity FAR, proto je upřednostňovanou strategií právě tvorba pigmentů (Gorton and Vogelmann, 2003). Nejznámějším pigmentem je červený astaxantin, který je kromě toho, že pasivně absorbuje záření, také účinným antioxidantem. U řas žijících na povrchu ledovců byl nedávno nově popsán jiný pigment – purpurogalinová karboxylová kyselina-6-O- $\beta$ -D-glukopyranosidu. Tuto hnědou látku fenolové podstaty vytváří pro ochranu před UV například řasa *Mesotaenium berggrenii* (Remias et al., 2012). Další látkou vykazující absorpci UV záření je sporopolenin, avšak proti dříve zmíněným pigmentům je jeho absorpce v této oblasti poměrně nízká (Gorton and Vogelmann, 2003).

### 2.3 Fotoinhibice

Fotoinhibice je definována jako soubor procesů projevujících se snížením rychlosti fotosyntézy při zvyšující se ozářenosti (Obr. 2). Nicméně, i přes snižování až úplné zastavení fotosyntézy, nelze tento jev považovat za zcela negativní. Dochází k němu z velké části kvůli fotopoškození, ale současně je to mechanismus chránící buňky před enviromentálním stresem a poškozením fotosyntetického aparátu. Z toho vyplývá, že fotoinhibice nemusí nutně způsobovat nižší produktivitu a fixaci uhlíku autotrofy, neb nastává zejména tehdy, je-li organismus v nevyhovujících podmínkách a napomáhá je přežít (Demmig-Adams and Adams, 2003).



Obr. 2: Vztah intenzity světla a aktivity PSII (upraveno podle: Yamamoto, 2016).



Obr. 3: Fotoinhibice a cyklus opravy PSII (Upraveno podle Esa Tyystjärvi, 2009).

Mezi hlavní znaky fotoinhibice patří trvalé snížení účinnosti fotosyntézy projevující se sníženou hladinou zafixovaného CO<sub>2</sub> nebo uvolněného O<sub>2</sub> na jednotku absorbovaného fotonu. Konkrétně úroveň fotochemie ve fotosystému dva (PSII) na jednotku fotonů absorbovaných ve světlosběrných anténách PSII se trvale snižuje. Efektivita PSII je kvantifikována z chlorofylových fluorescenčních signálů a dosahuje maximální hodnoty 0,84, což odpovídá 84 % účinnosti přeměny energie

absorbovaných fotonů na chemickou energii (viz kapitola 2.5.2). Dalším znakem je inaktivace a degradace reakčního centra PSII. Toto jádro se skládá ze dvou proteinů – D1 a D2. Při fotoinhibici nejprve dojde k inaktivaci proteinu D1, a teprve poté následuje degradace jádra reakčního centra PSII. Protein D1 se inaktivuje už při krátkodobých expozicích příliš silnému záření. Hladinu D1 může snižovat i stres nesouvisející s UV zářením. K poškození a odbourávání D1 dochází i za příznivých podmínek, kdy je však obrat tohoto proteinu mimořádně rychlý (Obr. 3). Aby byla fotoprotekce maximální, dochází k přeměně přebytečného slunečního záření na neškodnou tepelnou energii, která je následně vyzářena zpět do okolí. K přeměně světla na tepelnou energii dochází zejména v xantofylových cyklech a na specializovaných proteinech ze skupiny světlosběrných proteinů (Demmig-Adams and Adams, 2003).

## 2.4 Ekologie a diverzita sněžných řas

Definice sněžných řas se různí. Někdy je tato skupina pojímána širěji a zahrnuje jak psychrofilní, tak psychrotrofní, převážně jednobuněčné fotoautotrofní organismy, které se vyskytují v prostředí sněhu. Ne všechny však obsahují velká množství pigmentů. V užším slova smyslu pak sněžné řasy definujeme jako psychrofilní organismy schopné tvořit



Obr. 4: Nápadné zbarvení sněhu díky řase *Ch. nivalis* ([www.countryliving.com](http://www.countryliving.com)).

zabarvení sněhu. Většina jich patří převážně do skupiny Chlamydomonadales (Chlorophyta) (Leya, 2013). Tvoří tak poměrně jasně definovanou skupinu, která zahrnuje jiné druhy než ostatní ekologické skupiny fotoautotrofních mikroorganismů žijících v chladných oblastech, které se vyskytují v celé řadě dalších sladководních habitatů, jako jsou jezera, mělké mokřady, či povrchy ledovců (Laybourn-Parry et al., 2012).

To, v jaké hloubce sněhu sněžné řasy žijí, tj. jestli se vyskytují v povrchové vrstvě, nebo v hlubších vrstvách sněhu, je závislé i na míře dopadajícího záření. Právě intenzita záření a teplota jsou pro sněžné řasy stěžejními parametry a společně s druhovým zařazením a



stadiem životního cyklu jsou rozhodující pro případnou barevnost sněhu (Laybourn-Parry et al., 2012).

Barevné sněhy se vyskytují na sněhových polích vytrvávajících přes léto – tedy v horských a polárních oblastech. Nejčastější barvy jsou zelená a červená (Obr. 4), nicméně známé jsou i oranžové či fialovo-šedé květy. Zatímco zelené pigmenty (chlorofyly) většinou převažují u troficky aktivních stádií, červené jsou naopak znakem odpočívajících stádií (hypnospor a hypnozygot) obsahujících hodně karotenoidů (Leya, 2013). Přestože sněžné řasy žijí ve sněhu, je pro jejich růst nezbytná přítomnost tekuté vody. Tu běžně zajišťuje silné sluneční záření v jarním a letním období (Morgan-Kiss et al., 2006).

Ne všechny sněžné řasy rostou na z hlediska ozáření vysoce exponovaných lokalitách. Některé druhy preferují zastíněné lesních habitatech v nižších nadmořských výškách (Hoham and Duval, 1991). Předpokládá se, že tyto řasy budou méně adaptovány na vysoké intenzity záření, a to jak fotosynteticky aktivní záření (FAR), tak UV (Blumthaler et al., 1994). Kromě toho, že lesní habitaty jsou zastíněné, liší se i v tloušťce sněhové pokrývky a množství živin (Hoham and Duval, 1991). Sněžné řasy jsou v lesních habitatech pozorované méně často než řasy na sněhových polích v bezlesí, a jejich zástupci jsou často z rodu *Chloromonas*. Ve srovnání s druhy z bezlesí je u lesních druhů častější zelené a oranžové zabarvení sněhu, zatímco nápadné červené zabarvení bylo pozorováno jen vzácně. Nicméně striktní vymezení hranice mezi lesními kmeny a kmeny z bezlesých habitatů je obtížné, neboť mnoho druhů sněžných řas toleruje široké spektrum enviromentálních podmínek (Komárek a Nedbalová, 2007).

Druhů sněžných řas podílejících se na tvorbě barevných sněhů je relativně málo. Patří mezi ně hlavně bičíkovci z rodu *Chlamydomonas*, *Chloromonas*, *Chlainomonas*



Obr. 5: Zastíněný lesní habitat a typicky zelené zabarvení sněhu v důsledku růstu sněžných řas (Foto: Linda Nedbalová).

a nepohyblivé rody *Raphidonema* a *Koliella* (Komárek a Nedbalová, 2007, Laybourn-Parry et al., 2012).

Nejdůležitější skupinou sněžných řas je řád Chlamydomonadales (Chlorophyta). Pod ten spadají řasy z rodů *Chlamydomonas* či *Chloromonas* a také méně častý

rod *Chlainomonas*. Zatímco pohyblivá stádia řas těchto rodů mají dva bičíky (Hoham a Duval, 2001), zygoty pak bičíky ztrácí a přechází do stádia zygospory. Ty mají pevnou stěnu a brání tak vyschnutí, takže řasy v tomto stádiu vydrží až do další sezóny (Hoham, 1980). Zatímco zástupci rodu *Chlamydomonas* (reprezentované zejména druhem *Ch. nivalis*) obývají výše položené a více exponované habitaty (Gorton et al., 2001), zástupci rodu *Chloromonas* se vyskytují také v níže položených a zastíněných lokalitách (Obr. 5) (Hoham et al., 2000). Dalším rozdílným znakem je, že zatímco *Ch. nivalis* tvoří červené a hladké cysty, u rodu *Chloromonas* jsou běžné oranžové nebo zelené, které mají výrazné povrchové struktury. Výrazným rozlišovacím znakem je i tvar chloroplastu. Řasy rodu *Chlamydomonas* mají vždy pohárkovitý chloroplast bez perforací, u zástupců rodu *Chloromonas* může být pohárkovitý chloroplast perforovaný, různě rozvětvený nebo i hvězdicovitý (Pröschold et al., 2001).

Zástupcem rodu *Chlamydomonas* je například druh *Ch. nivalis*, který se vyskytuje celosvětově, například v Arktidě (Stibal et al., 2007), v pohoří Sierra Nevada v Kalifornii (Duval et al., 1999) a v alpínských oblastech v Evropě (Remias et al., 2005). Tento druh byl zaznamenán i v České republice v Krkonoších ve výškách nad 1250 m n. m. (Nedbalová et al., 2008). *Ch. nivalis* je na základě těchto nálezů považován za kosmopolitně se vyskytující druh, nicméně její určování je problematické. Není proto neobvyklé, že jako *Ch. nivalis* je mylně označen jiný druh, jak tomu bylo například v případě kmenů řas *Chloromonas typhlos* (SAG 26.86) nebo *Chloromonas reticulata* (SAG 29.83) izolovaných z červeného sněhu v Kaskádovém pohoří v USA (Matsuzaki et al., 2012).

Zástupci sněžných řas z rodu *Chloromonas* jsou pak například *Cr. brevispina* či *Cr. nivalis*. Ani dělení podle pigmentu není směrodatné. *Cr. nivalis*, ač patří do rodu *Chloromonas*, tvoří nejen zelené sněhy, ale oranžové či růžové a obsahuje stejný pigment jako *Ch. nivalis* – astaxantin. Ten v případě druhé zmíněné řasy může za její nápadně červenou barvu. Navíc, byť spadá do skupiny obývajících spíše lesní habitaty, lze ji často nalézt také na letních sněhových polích, a to jak v alpských, tak polárních oblastech (Remias et al., 2010a). *Cr. brevispina* je příkladem sněžné řasy preferující zastíněné lokality. Ve sbírkách jsou uloženy kultury tohoto druhu pocházející z lesnaté oblasti Lac Laflamme (Quebec, Kanada), která se nachází v nadmořské výšce do 700 m n. m., či z oblasti Jay Peak (Vermont, USA) s nadmořskou výškou do 1200 m n. m. ([www.utex.org](http://www.utex.org)).

Sněžné řasy z řádu Chlamydomonales mají složité životní cykly (Obr. 6), při kterých dochází ke změnám životních forem i skladby pigmentů. Na jaře stoupá teplota nad bod

mrazu a dochází k natávání sněhové pokrývky. To vede k zvýšení dostupnosti kapalné vody, živin a světla pro buňky sněžných řas, které do té doby odpočívaly v dormantních stádiích (Laybourn-Parry et al., 2012).

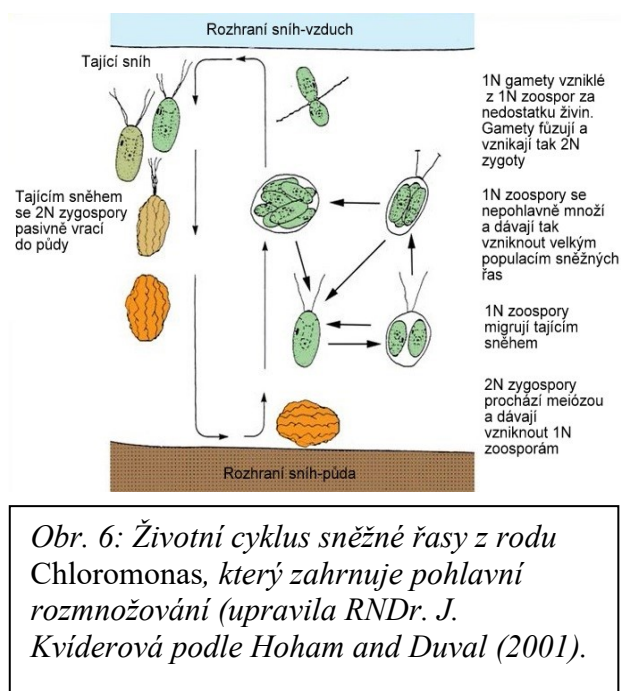
Tyto klidové kulovité buňky se silnou buněčnou stěnou a hladkým vnějším

povrchem se nazývají hypnoblasty (Weiss, 1983). Ač se jedná o klidové stádium, jsou hypnoblasty fotosynteticky aktivní (Gorton et al., 2001). Navíc jsou nesmírně odolné vůči opakovanému vymrzání a tání i silnému slunečnímu záření. Na rozdíl od předchozí fáze životního cyklu, ve stádium hypnoblastu už řasy nejsou schopné aktivní migrace sněhovou pokrývkou. Hypnoblasty se nedělí, nemají bičíky, jsou nepohyblivé a v zimě opětovně zapadají sněhem (Remias et al., 2005). Druhy z rodu *Chloromonas* mají většinou oválné cysty s výrazně strukturovanou stěnou, které patrně plní obdobnou funkci jako hypnoblasty druhu *Ch. nivalis* (Remias et al. 2010a).

Mezi adaptace na chladné prostředí patří mimo jiné vysoký podíl nenasyčených mastných kyselin (Bidigare et al., 1993). Současně estery astaxantinu, které v létě sloužily zejména jako ochrana před silným slunečním zářením a kumulovaly se v lipidových kapičkách kolem chloroplastů a jádra, zabírají většinu objemu buňky, čímž snižují obsah vody a předchází vzniku ledových krystalků (Gorton et al., 2001). Ostatně obsah astaxantinu v hypnoblastech u *Ch. nivalis* je zhruba 20 krát vyšší než obsah chlorofylu *a*. Hypnoblasty ve sněhové pokrývce přetrvávají až do jara, kdy dochází k opětovnému přísunu tekuté vody (Remias et al., 2005).

## 2.5 Měření fotosyntetických charakteristik sněžných řas

Pigmenty produkované sněžnými řasami jsou využívány v mnoha odvětvích (např. doplňky stravy, kosmetika). Vzhledem ke komplexní adaptaci sněžných řas na extrémní prostředí se předpokládá, že by mohly být zdrojem dalších specifických látek (Leya, 2013). Proto je potenciálně zajímavé využití této skupiny v biotechnologiích. Nicméně právě



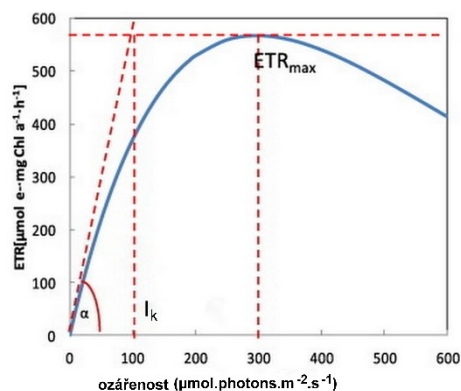
v biotechnologiích se klade vysoký důraz na udržení vlastností výsledného produktu, a ty samozřejmě vycházejí z vlastností řas. Proto je důležité ověřit, zda konkrétní druhy sněžných řas dlouhodobou kultivací ztrácejí své vlastnosti, či nikoliv.

Některé laboratoře se pokoušejí uchovávat řasy pomocí kryoprezervace. Vycházejí totiž z předpokladu, že opakovaným přeočkováváním do nového média a následného kultivování za umělých laboratorních podmínek nelze zaručit genotypovou a fenotypovou stabilitu. Řasy tak mimo původní evoluční tlak mohou snižovat expresi pro podmínky kultivace zbytečných znaků, včetně ochranných a světlosběrných pigmentů. Pro toto tvrzení však existuje pouze malé množství důkazů a současně se ukazuje, že se míra tohoto jevu je patrně druhově specifická (Day and Fleck, 2015; Day et al., 1997). Například kmeny druhu *Chlorella vulgaris* zůstaly genotypově i funkčně stabilní po celá desetiletí (Muller et al., 2005). Uváděná nevratná ztráta schopnosti produkce ketokarotenoidů u *Ch. nivalis* (Day and Fleck, 2015) však patrně souvisí s tím, že kmeny interpretované jako *Ch. nivalis* ve skutečnosti patří do jiných druhů a nejedná se o pravé sněžné řasy (L. Nedbalová, os. sdělení). Lze tedy říci, že stabilita ekofyziologických vlastností sněžných řas v čase nebyla dosud řádně otestována.

### 2.5.1 Světelné křivky

Světelné křivky popisují vztah mezi rychlostí fotosyntézy a intenzitou záření (Chalker, 1980). Tradiční světelné křivky se měří pomocí produkce kyslíku v závislosti na intenzitě záření. Jedná se o metodu přímou, která může být použita například v kombinaci s metodou světlých a tmavých lahví (Aalderik and Jovin, 1997). „Rychlé“ světelné křivky, dále RLC (rapid light curves), se měří nepřímo pomocí fluorometrie a korelovaného parametru k rychlosti fotosyntézy, zvaného ETR, což je rychlost elektronového transportu (Cruz and Serôdio, 2008). Tato měření nám umožňuje fluorescence chlorofylu. Rostlinou pohlcené záření je zčásti využito při fotosyntéze, z části přeměněné na teplo a část je vyzářena zpět do okolí ve formě fotonů vyšší vlnové délky, než v jaké bylo přijato. Parametr ETR je v RLC na ose y, jakožto veličina korelovaná s rychlostí fotosyntézy. Tato hodnota je založená na vztahu mezi hrubou fotosyntézou a fluorescencí *in vivo* chlorofylu PSII, stejně jako na vztahu mezi efektivním kvantovým výtěžkem fluorescence a kvantovým výtěžkem produkce kyslíku (Figueroa et al., 2003). Při vynesení do grafu se pak na ose x (nezávisle proměnná veličina) uvádí intenzita FAR a to nejčastěji v jednotkách  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Chalker, 1980).

Světelné křivky mohou mít v zásadě dvojí tvar v závislosti na odolnosti organismu či na maximální míře ozáření, kterou jsme byli schopni v experimentu použít. V případě, že záření nebylo příliš silné, nebo byl organismus dostatečně adaptován na vysoké intenzity záření, pak křivka zdánlivě donekonečna rovnoměrně roste, jak roste spolu se světlem i ETR. Naopak v případech, kde dojde k saturaci PSII, dosáhne ETR svého maxima (hodnota, při které jsou PSII na maximální kapacitě), načež může dojít z důvodu fotoinhibice k opětovnému poklesu (Chalker, 1980).

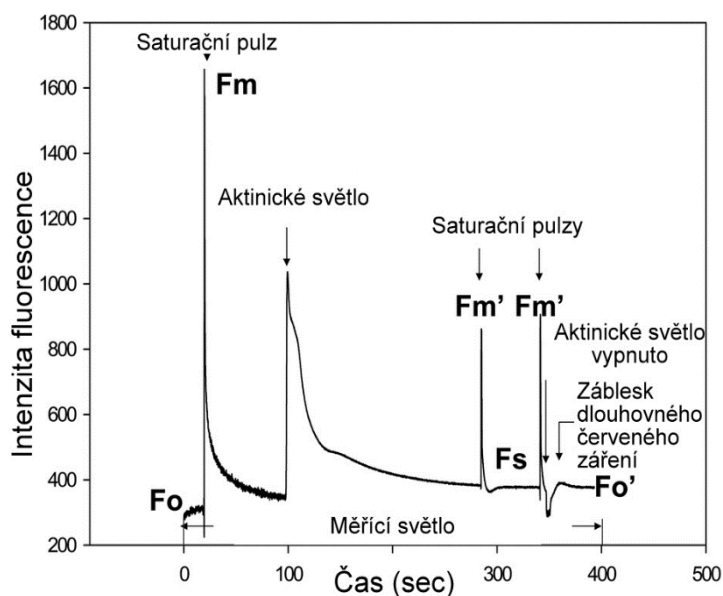


*Obr. 7: Znázornění parametrů  $\alpha$  a  $I_k$  na světelné křivce u modelu s fotoinhibicí. Účinnost fotosyntézy s přibývajícím zářením roste, než dosáhne svého maxima a dojde k fotoinhibici (upraveno podle Undurraga et al., 2016).*

Kromě celkového tvaru jsou u světelných křivek důležité ještě dva parametry –  $\alpha$  a  $I_k$  (Obr. 7). Parametr  $\alpha$  vyjadřuje počáteční sklon (směrnici) křivky. Obecně se předpokládá, že počáteční sklon křivky je funkcí světelných reakcí v fotosyntéze a že sklon klesá, protože rychlost metabolismu buněčného organického uhlíku je omezena (Nielsen and Jørgensen, 1968).  $I_k$  je průsečík tečny vedené bodem maximální ETR, což je bod inflexe křivky, a přímky sestavené pomocí extrapolace lineární části dané křivky (www.aquation.com.au). Hodnota  $I_k$  udává, kdy světlosběrné aparáty řasy začínají být satureovány světlem. Hodnotu  $I_k$  je tedy možné nazvat minimálním saturačním ozářením (Ralph and Gademann, 2005).

## 2.5.2 Maximální kvantový výtěžek

Aby sestrojování světelných křivek a jejich následné porovnávání mělo smysl, je třeba, aby byly řasy v perfektní kondici. O tom, jak prosperují, a zda nejsou ve stresu, se můžeme přesvědčit pomocí maximálního kvantového výtěžku ( $F_v/F_m$ ). Ten je zadefinovaný vzorcem  $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$ , kde  $F_v$  značí variabilní fluorescenci a  $F_m$  maximální fluorescence, což je stav, kdy už došlo k zahlcení PSII. Při minimální ozáření získáme základní fluorescenci ( $F_0$ ), která se využívá při výpočtu variabilní fluorescence ve vztahu:  $F_v = F_m - F_0$  (Obr. 8) (Strasser et al., 2000).



Obr. 8:  $F_V/F_M$  křivka vypovídající o maximální kapacitě PSII, tedy maximálním kvantovém výtěžku PSII, se dá znázornit jako intenzita fluorescence v průběhu času. Vzorek se ozařuje pulsy měřicího světla o nízké intenzitě. V místě saturačního pulzu dochází k dočasnému zahlcení fotochemických cest. Akinetické světlo je středně silné nejčastěji červené světlo optimální pro fotosyntézu. Dlouhovlnné záření je pak světlo na hranici červeného a IR záření.  $F_m$  je maximální fluorescence při adaptaci na tmu,  $F_m'$  pak maximální fluorescence při adaptaci na světlo. Obě hodnoty se odvíjí od množství funkčních fotosystémů.  $F_o$  a  $F_o'$  je minimální výtěžek fluorescence chlorofylu při adaptaci na tmu a na světlo a závisí na množství chlorofylu-a a množství funkčních fotosystémů připojených ke světlosběrným komplexům.  $F_s$  je intenzita fluorescence v ustáleném stavu (Upraveno podle: Lagorio et al., 2015; [www.ibot.cas.cz](http://www.ibot.cas.cz)).

$F_V/F_M$  slouží jako indikátor stresu. Nízké hodnoty  $F_V/F_M$  indikují nevhodné enviromentální podmínky či nevyhovující způsob kultivace. Proto má velký vliv složení média, stáří kultury a kultivační teplota. Pro standardní měření  $F_V/F_M$  musí být před začátkem měření vzorek zatemněn na dostatečně dlouhou dobu. Teoreticky maximální hodnota  $F_V/F_M$  je 0,84, protože rostliny jsou schopné využít energii FAR maximálně z 84 %. Jako hraniční hodnota pro dobrou kondici fotoautotrofního organismu je pak uznávána hodnota  $F_V/F_M = 0,6$  (Murchie and Lawson, 2013).

Jedním ze způsobů, jak lze měřit maximální kvantový výtěžek, je PAM fluorometrie. PAM je zkratka pro pulzně amplitudovou modulaci. Ta se využívá při kódování a zpětné interpretaci informace při měření fluorescence chlorofylu – tedy fluorometrie. PAM fluorometrie je neinvazní biochemická technologie využíváná v tzv. PAM-fluorometrech, přičemž přístroj FluorCam používaný v této

práci je jeho podtypem ([www.sites.tufts.edu](http://www.sites.tufts.edu)).

Typicky se FluorCam používá k detekci dynamiky a prostorové heterogenity u fluorescenční emise rostlin. Zjednodušeně řečeno přístroj pomocí LED zářivky pulzně – tedy krátce – ozáří rostlinu, pak zhasne a změří, v jaké intenzitě a emisním spektru se světlo vrátí. Energie absorbovaných fotonů je totiž z části využita pro fotosyntetické děje, ale část se vždy vrátí ve formě fluorescence a tepla. Informace je následně zachycená pomocí CCD snímačů, technologie využívané i v digitálních zrcadlovkách. Informace je dále uložena bezztrátově jako „světlo a jeho intenzita“. Naměřená data jsou zobrazena jako dvourozměrné mapy. FluorCam umožňuje měřit  $F_v/F_m$ , Kautského indukci, zhášecí (quenching) analýzu či právě RLC jednotlivých vzorků. Heterogenitu naměřených parametrů ovlivňují infekce, různé stáří buněk, mutace a stres ([www.psi.cz](http://www.psi.cz)).



### 3 Cíle a hypotézy

Hlavním cílem této práce bylo porovnat rozdíly fyziologických charakteristik fotosyntézy laboratorních kmenů sněžných řas v závislosti na typu habitatu.

Sněžné řasy obývají velmi extrémní lokality, které lze mimo jiné dělit podle intenzity slunečního záření. Jedná se o lesní zastíněná stanoviště a exponovaná bezlesí. Populace řas z různých prostředí (zastíněných x bezlesých habitatů) jsou během svého života vystaveny různé míře FAR a UV záření. Je pravděpodobné, že se jejich reakce na UV záření a vysoké intenzity FAR liší, protože stínomilné kmeny by neměly být adaptovány na vysokou intenzitu záření. Cílem této práce bylo ověřit, jestli tento předpoklad platí pro kmeny sněžných řas pěstované v naší laboratoři.

Dalším cílem bylo ověřit, jestli jsou tyto adaptace stabilní, či jestli při dlouhodobé kultivaci v laboratorních podmínkách dochází k výraznějším změnám fotosyntetických parametrů.

Cíle a hypotézy diplomové práce v bodech:

- 1) Srovnání parametrů „rychlých“ světelných křivek kmenů z bezlesí a lesních habitatů.  
*Kmeny z bezlesých lokalit budou mít nižší hodnoty  $\alpha$  – tedy pomalejší start fotosyntézy za nízké intenzity záření než kmeny ze zastíněných lokalit. Také u nich na rozdíl od kmenů ze zastíněných habitatů pravděpodobně nedojde k fotoinhibici.*
- 2) Porovnání stavu fyziologických charakteristik fotosyntetického aparátu s rozestupem tří let.  
*Kmeny po kultivaci v laboratorních podmínkách si zachovaly adaptace na jejich původní prostředí a jejich reakce na FAR se tím pádem nezměnila.*
- 3) Srovnání stresové reakce kmenů indukované UV-A zářením pomocí PAM fluorometru.  
*Kmeny ze zastíněných habitatů budou vykazovat silnější stresovou reakci při ozáření UV než kmeny z bezlesí.*



## 4 Metodika

### 4.1 Kultivační média

Kmeny jsem kultivovala v tekutých médiích. Pro své experimenty jsem řasy pěstovala v médiích BBM, 3N BBM nebo BBM + Soil v závislosti na kmenu a doporučených údajích veřejných sbírek UTEX a CCCryo ([www.utex.org](http://www.utex.org), [www.cccryo.fraunhofer.de](http://www.cccryo.fraunhofer.de)), odkud pocházela část kmenů.

#### 4.1.1 BBM

BBM médium, též zvané Bold-Basal či Bristol médium, je základní médium pro kultivaci terestrických řas a sinic (Bischoff and Bold, 1963).

V laboratoři bylo namícháno ze zásobních roztoků:

1.  $\text{NaNO}_3$ .....25 g/1000 ml
  2.  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....5 g/1000 ml
  3.  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....7,5 g/1000 ml
  4.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....7,5 g/1000 ml
  5.  $\text{NaCl}$ .....2,5 g/1000 ml
  6.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....17,5 g/1000 ml
  7. EDTA+KOH..... tj. 5 g Chelatonu III + 3,1 g KOH /100 ml
  8.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....0,498 g +  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ...0,1 ml /100 ml
  9.  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .....1,142 g/100 ml
  10. Roztok mikroprvků – do 1000 ml
- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....8,82 g
- $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ .....1,44 g
- $\text{MoO}_3$ .....0,71 g (nebo  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....0,242 g)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ .....1,57 g
- $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....0,49 g

Do litrové Erlenmeyerovy baňky jsem přidala po 10 ml zásobních roztoků číslo 1–6 a 1 ml zásobních roztoků číslo 7–10. Následně jsem baňku s roztoky za stálého míchání doplnila destilovanou vodou do celkového objemu 1 l. Výsledný roztok jsem rozdělila do dvou klávovacích lahví a vyklávovala v autoklávu Tuttnauer 2840-EL-D (15 minut při teplotě

121 °C). Láhve byly před zahájením klávování označeny speciální klávovací páskou, aby bylo jisté, že médium dosáhlo požadované teploty.

#### **4.1.2 3N BBM**

Médium 3N BBM jsem připravila obdobně jako médium BBM. Od BBM média se liší jen přidáním trojnásobného množství zásobního roztoku číslo 1 ( $\text{NaNO}_3$ ).

#### **4.1.3 BBM + Soil**

Médium BBM + Soil bylo připraveno obdobně jako BBM. Od BBM se liší tím, že se do něj před přidáním destilované vody přimíchá 50 ml půdního výluhu. Ten napomáhá kultivaci těžko pěstovatelných druhů, nebo se užívá pro kultivaci kmenů řas, u kterých nejsou známe přesné nutriční požadavky. Nicméně kvalita roztoku se značně liší a odvíjí se od volby konkrétní zeminy. Je nutné, aby půda neobsahovala pesticidy ani jiná hnojiva. Ideální jsou proto lesní půdy – obzvláště listnatých lesů. (Andersen, 2005).

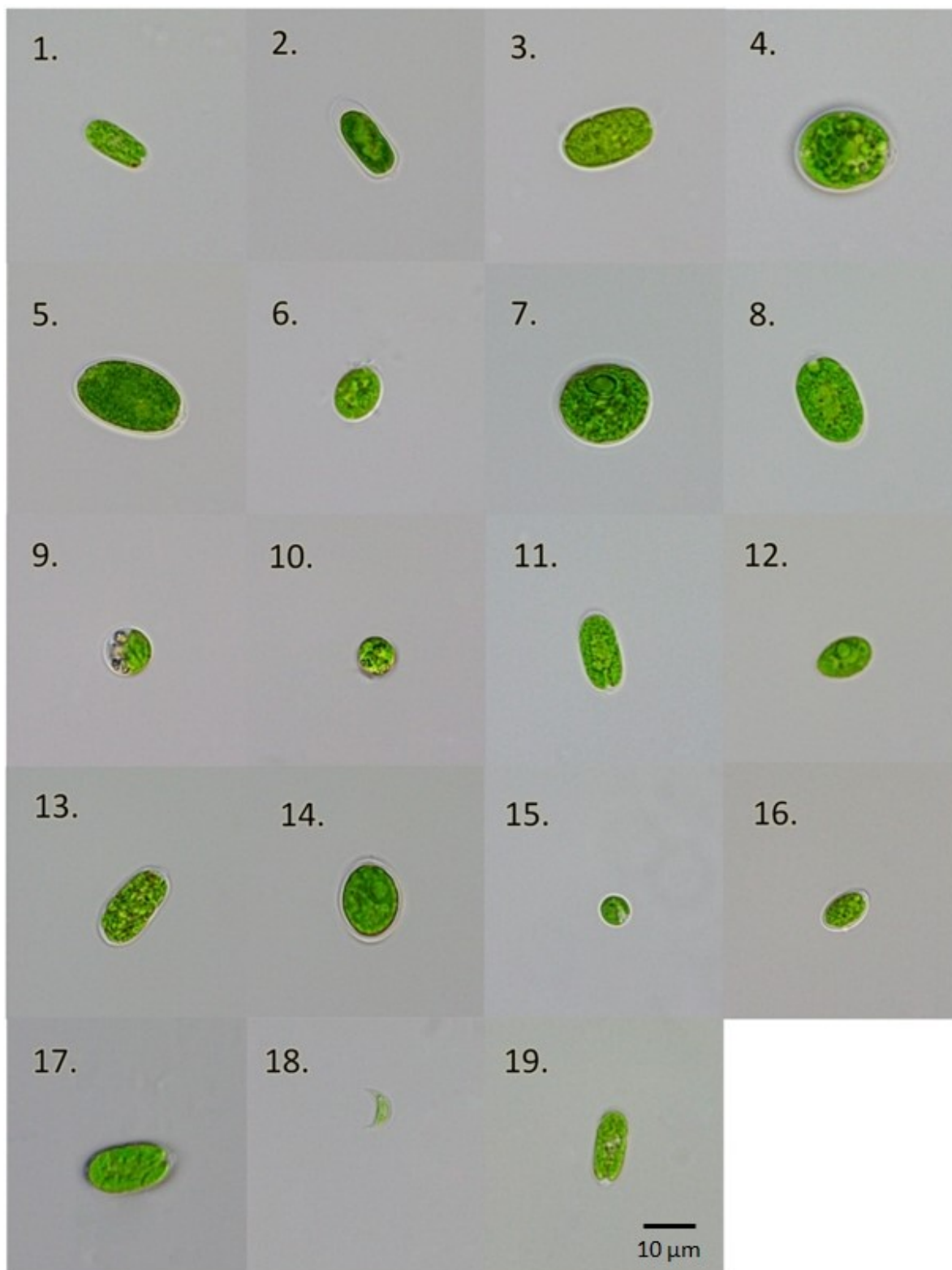
### **4.2 Kmeny sněžných řas**

Kmeny řas pocházejí ze sbírek CCCryo a UTEX ([www.cccryo.fraunhofer.de](http://www.cccryo.fraunhofer.de), [www.utex.org](http://www.utex.org)) a byly izolovány z nejrůznějších oblastí světa. Dále mi pro mé experimenty byly poskytnuty kmeny ze sbírky školitelky RNDr. Lindy Nedbalové, Ph.D. (Tabulka 1, Obr. 9). Pro přehlednost jsem k jednotlivým kmenům přidělila pracovní kódy skládající se z čísla od jedné do devatenácti (pořadí odpovídá Tabulce 1 a též shrnující tabuli s mikrofotografiemi (Obr. 9) a z písmene ,b‘ pro kmeny z bezlesí nebo ,z‘ pro kmeny ze zastíněných lokalit.

Tabulka 1: Přehled kmenů použitých pro experimenty.

Žlutě jsou označeny kmeny z bezlesých lokalit (b), modře zastíněných lokalit (z) a zelené jsou referenční kmeny pocházející z planktonu zamrzlých antarktických jezer. Je uvedeno kultivační médium a v případě dostupnosti informace i nadmořská výška lokality, upřesnění původu a kód, pod kterým lze daný kmen vyhledat ve veřejných sbírkách.

Kmen	Pracovní kód	Sbírkový kód	Médium	Nadmořská výška (m n.m.)	Lokalita
<i>Chloromonas reticulata</i>	1-b	-	BBM	490	Tromsø, Norsko
<i>Chloromonas reticulata</i>	2-b	-	BBM	2057	Ľadové pleso, Vysoké Tatry, Slovensko
<i>Chloromonas hohamii</i>	3-b	UTEX B SNO151	BBM + Soil	2691	Mt Lemmon, Arizona, USA
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Moewusii -clade, clade "B")	4-b	-	BBM	2485	Gossenköllensee, Alpy, Švýcarsko
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Stephanosphaera -clade, clade "C")	5-b	-	BBM	2431	Furkapass, Alpy, Švýcarsko
<i>Chloromonas brevispina</i>	6-b	CCCryo 091-99	BBM	104	Raudfjorden, Špicberky, Norsko
<i>Chloromonas</i> sp.	7-b	CCCryo 044-99	3N BBM	-	Lilliehoeekfjorden, Špicberky, Norsko
<i>Chloromonas alpina</i>	8-b	CCCryo 089-99	3N BBM	106	Makarovbreen, Špicberky, Norsko
<i>Chloromonas nivalis</i>	9-b	CCCryo 004-99	3N BBM	739	Reuschfjellet, Špicberky, Norsko
<i>Chloromonas rostafinskii</i>	10-b	CCCryo 009-99	3N BBM	0	Špicberky, Norsko
<i>Chloromonas platystigma</i>	11-b	CCCryo 020-99	3N BBM	480	Langskipet, Špicberky, Norsko
<i>Chloromonas</i> sp. ("SA"-clade, "A2"-clade)	12-z	-	BBM + Soil	1060	Meandry Labe, Krkonoše, Česká republika
<i>Chloromonas rosae</i> var. <i>psychrophila</i>	13-z	UTEX SNO120	BBM	945	Jay Peak, Vermont, USA
<i>Chloromonas tughillensis</i>	14-z	UTEX SNO91	BBM	381	Whetstone Gulf State Park, New York, USA
<i>Chloromonas reticulata</i>	15-z	-	BBM	-	naučná stezka, Kralický Sněžník, Česká republika
<i>Chloromonas chenangoensis</i>	16-z	UTEX SNO147	BBM	350	Hamilton, New York, USA
<i>Chloromonas pichinchae</i>	17-z	UTEX B SNO33	BBM + Soil	1417	Teanaway River, Washington, USA
<i>Monoraphidium</i> sp.	18-z	-	BBM	236	jezero Naděje, ostrov Jamese Rosse, Antarktida
<i>Chlamydomonas raudensis</i>	19-z	CCCryo 125-00	BBM	100	Taylorovo údolí, Antarktida

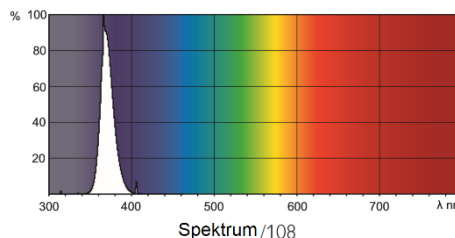


Obr. 9: Mikrofotografie kmenů použitých pro experimenty. *Cr. reticulata* (1-b), *Cr. reticulata* (2-b), *Cr. hohamii* (3-b), *Chlamydomonas* sp. (4-b), *Chlamydomonas* sp. (5-b), *Cr. brevispina* (6-b), *Chloromonas* sp. (7-b), *Cr. alpina* (8-b), *Cr. nivalis* (9-b), *Cr. rostafinskii* (10-b), *Cr. platystigma* (11-b), *Chloromonas* sp. (12-z), *Cr. rosae* (13-z), *Cr. tughillensis* (14-z), *Cr. reticulata* (15-z), *Cr. chenangoensis* (16-z), *Chloromonas pichinchae* (17-z), *Monoraphidium* sp. (18-z) a *Ch. raudensis* (19-z).

## 4.3 Kultivace

### 4.3.1 Inkubátor

Úspěšně jsem rozpěstovala všechny kmeny. Řasy byly kultivovány v termostatu-inkubátoru Q Cell 140 INOX (Pol-Lab, Polsko). Inkubátor byl vybaven zářivkou L 8W/640 BASIC Cool White 385 lm (OSRAM, Německo)  $\sim 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . V inkubátoru byla též nainstalována UV-A zářivka TL Mini Blacklight Blue TL 8W BLB 1FM (Philips, Nizozemsko). Trubice byla vyrobena z tmavě modrého skla, které propouští UV-A záření ale jen minimální dávky viditelného světla (Obr. 10). Intenzita záření v místě expozice kmenů, tj. 17 cm od zářivek, byla  $\sim 20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (FAR), respektive  $0,23 \text{ mW cm}^{-2}$ , což je  $\sim 8,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (UV-A).



Obr. 10: Spektrum použité UV-A zářivky (upraveno podle [www.philips.com](http://www.philips.com)).

Řasy jsem kultivovala v Erlenmeyerových baňkách v 50 ml média (viz. Tabulka 1), při teplotě  $8^\circ\text{C}$ . Doba kultivace se pohybovala v rozmezí od 3 týdnů do 2 měsíců, podle velikosti inokula při přeočkovávání a rychlosti růstu kultur. Inokulum mělo objem 0,5–1 ml v závislosti na kondici dané řasy. U pomalu rostoucích kmenů bylo inokulum větší, aby vzorek dříve dosáhl koncentrace buněk potřebné pro měření.

### 4.3.2 Mikroskop

Pro kontrolu kmenů jsem přenesla kapku na podložní sklíčko, zakryla krycím sklíčkem a dále sledovala stav kultur na mikroskopu Nikon Eclipse 400 (Nikon, Japonsko) a kontrolovala v software QuickPHOTO camera 3.1. Pro vyhotovení mikrofotografií jsem použila mikroskop Olympus BX43 (Olympus, Japonsko) a data jsem následně upravila v software Olympus cellSens Entry.

## 4.4 Měření světelných křivek

Světelné křivky jsem měřila PAM fluorometrem (FluorCam 800MF, Photon Systems Instruments, Česká republika) s využitím software FluorCam7. Pro měření na PAM jsem kmeny nejprve přeočkovala do 24-jamkových destiček se čtyřmi opakováními pro každý kmen, a následně za stálého chlazení a zatemnění transportovala namísto měření (jiná budova) v polystyrénové termoizolační krabici. Z důvodu aklimace byly následně kmeny před

měření ještě vystaveny po dobu deseti minut při mírném slunečním záření za neustálého chlazení. Následně byly kmeny na patnáct minut zatemněny. Před měřením bylo ze vzorků sejmuto plastové víčko, aby nedocházelo k jeho zamlžení, které by mohlo ovlivňovat optické vlastnosti prostředí a zkreslit tak výsledná data.

Z naměřených dat jsem následně určila relativní rychlosti přenosu elektronu (rETR) ve fotosystémech jednotlivých kmenů.

#### 4.4.1 Protokol na měření „rychlých“ světelných křivek

Protokol užitý pro měření jen RLC začínal měřením  $F_0$ . Celková doba tohoto měření byla 20,1 s a měření začínalo okamžitě se spuštěním protokolu. Fotoperioda měřících záblesků byla 2 s a každý záblesk trval 1,6 sekundy. Intenzita světla byla standardní pro toto měření. Přesná hodnota není v parametrech přístroje uvedena, nicméně jedná se o velmi slabé světlo z modrého spektra. Protože má modré světlo i při slabém záření vysokou energii, dochází při opakovaných měřeních v krátkých časových intervalech k jevu nazvanému aktinický efekt. Při aktinickém efektu dochází k chybovému měření, neb i při slabém záření vzrůstá fluorescence, protože i slabé světlo je schopné z důvodu relativně vysoké energie modrého světla spustit fotosyntézu (Thorington, 1980). Abych této chybě předešla, můj protokol obsahoval celkem 7 měřících záblesků s nestandardně dlouhým intervalem (2 s) mezi nimi. Výsledná hodnota  $F_0$  byla stanovena zprůměrováním výsledků těchto měření.

Po změření  $F_0$  následovala fáze měření  $F_M$  za použití saturačního pulzu. Záblesk saturačního pulzu byl dlouhý 600 ms a jeho síla odpovídala 50 % maximální intenzity přístroje – tzn.  $1004 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Po projití iniciační fáze a měření parametrů  $F_0$ , saturačního pulzu a  $F_M$  přístroj přešel k fázi s měřením světelných křivek, k čemuž bylo použito aktinické světlo o různých intenzitách. Toto měření probíhalo v patnácti krocích. Mezi jednotlivými kroky byla vždy pauza 40 ms a každý krok obsahoval světlo určité intenzity, jež

svítilo vždy po dobu 90 s. V prvním a druhém kroku byla síla aktinického světla 2 % – tedy  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a ve třetím a čtvrtém  $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , čímž se zdvojnásobila doba, po kterou

*Tabulka 2: Intenzita aktinického světla v jednotlivých krocích*

Krok	Síla aktinického světla (%)	Síla aktinického světla ( $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )
1	2	40
2	2	40
3	4	80
4	4	80
5	6	120
6	9	181
7	12	241
8	15	301
9	20	374
10	25	454
11	30	560
12	40	774
13	60	1198
14	80	1611
15	100	2008

působilo záření o těchto intenzitách, aby se dosáhlo ustáleného stavu. Pak už se intenzita světla v každém kroku zvedala (Tabulka 2).

Výsledky jsem srovnávala s daty z roku 2015, která naměřila stejným způsobem Bc. Lenka Mikešová (měla jsem k dispozici hrubá data naměřená na PAM fluorometru).

#### **4.4.2 Výpočet rETR a parametrů RLC**

Při zpracování dat pro RLC jsem použila hodnoty pro efektivní kvantový výtěžek (při adaptaci na světlo). Pro další práci s daty jsem vynechala hodnoty z kroku jedna a tři, neb v těchto bodech řasy osvětlovalo záření o stejné intenzitě jako v druhém a čtvrtém kroce. Pomocí těchto hodnot jsem následně spočítala rETR. Při výpočtu rETR se hodnota efektivního kvantového výtěžku vynásobí intenzitou světla v daném kroku a následně koeficientem 0,5 a 0,84. Koeficient 0,5 je hodnota  $P_{PSII}/P_{PPS}$  (odhad poměru fotonů absorbovaných PSII a celkového počtu fotonů absorbovaných fotosyntetickými pigmenty) ve stavu, kdy PSII absorbuje stejné množství fotonů jako ostatní fotosyntetické pigmenty. Hodnota 0,84 je empirický korekční koeficient založený na množství fotonů pohlcených chlorofylem *a* v PSII (Procházková et al., 2018a).

Výpočet tedy vycházel ze vzorce:  $rETR = Y(II) \times PFD \times P_{PSII}/P_{PPS} \times ETR\text{-Factor}$

Přičemž proměnné jsou:

$Y(II)$  = efektivní kvantový výtěžek PSII

PFD = hustota toku fotonů

$P_{PSII}/P_{PPS}$  = fotony absorbované PS II, (výchozí hodnota 0,5)

ETR-Factor = empirický korekční faktor (výchozí hodnota 0,84)

Následně jsem data dosadila do rETR-fit vzorce podle Klausa Herburgera z roku 2003. Ten byl zhotoven na základě matematických modelů Walsby (1997, s fotoinhibicí) a Webb et al. (1974, bez fotoinhibice). Ten umožňuje spočítat hodnoty  $I_k$  a  $\alpha$  pro modely v obou dvou případech. Při výběru správného modelu jsem zvolila data s menší sumou čtverců (fit). Data jsem následně vyhodnotila v software GraphPad Prism 5 (verze 5.00 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

#### **4.5 Měření stresových reakcí při ozáření UV-A**

Kmeny jsem přeočkovala ve třech duplikátech do šestijamkových destiček. Po transportu na místo měření jsem kmeny opět deset minut aklimatizovala na denním světle.

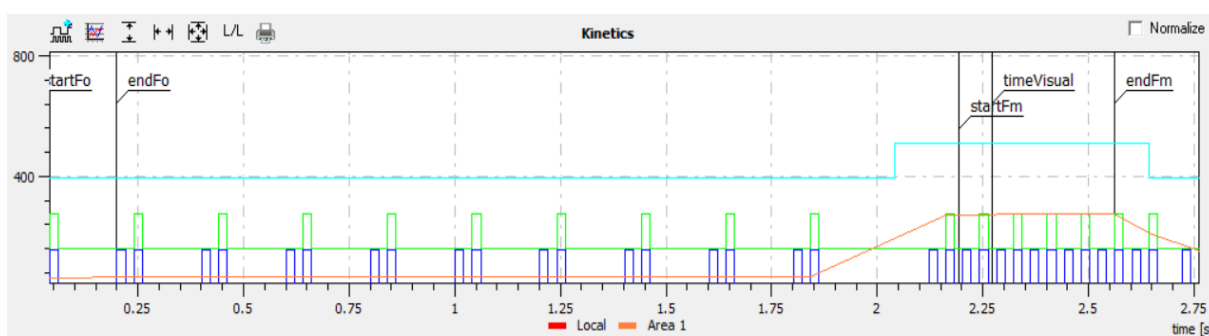
Posléze byly patnáct minut zatemněny a následně poprvé změřeny na užití krátkého protokolu měřícího  $F_V/F_M$  na přístroji FluorCam 800MF. Při měření jsem ze vzorků sejmula plastové víčko. Po skončení protokolu jsem je přenesla v chladícím boxu zpět a uložila do inkubátoru, kde jsem z nich opět sejmula víčko. Po dobu 24 hodin jsem řasy nechala vystavené přímému UV-A záření, při teplotě 8 °C. Poté jsem kmeny opětovně přenesla v chladícím boxu na PAM fluorometr a nechala je 10 minut aklimatizovat na denní světlo. Před měřením jsem je na 15 minut je zatemnila, pak z nich sejmula víčko a vložila je do PAM, kde proběhlo identické měření jako prvního dne. Následně jsem je vrátila stejným způsobem jako prve do inkubátoru, kde jsem vypnula UV-A zářivku. Víčko jsem na destičkách ponechala, takže dále už nedocházelo k dalšímu odpařování vzorku. Další měření jsem provedla stejným způsobem opět po 24 hodinách, abych ověřila, nakolik se jejich stav v tomto intervalu zlepšil.

#### 4.5.1 Protokol na měření maximálního kvantového výtěžku sněžných řas

Pro posouzení míry poškození fotosyntetického aparátu PSII UV-A zářením byla použita hodnota  $F_V/F_M$ . Jedno měření mělo dohromady 2,75 s. Doba měření  $F_0$  byla 2 s, s fotoperiodou 200 ms. Opětovně bylo použito vícero měřících záblesků s nestandardně dlouhým intervalem (2 s) mezi nimi, které byly posléze zprůměrovány. Měřících záblesků bylo použito 10.

Následný saturační záblesk při měření  $F_M$  měl sílu  $602 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a trval 600 ms. Provázelo ho sedm měřících záblesků a výsledná hodnota byla opětovně průměrována.

Pro názornost přikládám Obr 11.



Obr. 11: Průběh měření pro stanovení maximálního kvantového výtěžku. Zeleně jsou znázorněny měřící záblesky, modře jsou body měření, azurově je zanesen saturační záblesk. Oranžově pak aktuální hodnota fluorescence měřeného vzorku. V tomto případě *Chloromonas reticulata* (1-b) před zahájením pokusu s UV-A.



## 4.6 Statistické metody

Data jsem zpracovala v programu R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) a grafy vytvořila v programu GraphPad Prism (verze 5.00 pro Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA). Jako pozorování byly ve všech případech použity průměry replik měření pro jednotlivé kmeny řas.

Jako hlavní modely pro testování variability parametrů  $\alpha$  a  $I_k$  (vliv roku měření a habitatu) jsem využila jednocestnou analýzu variance (ANOVA) a split-plot ANOVu. Do meziročního srovnání byly zahrnuty pouze kmeny, které byly měřeny jak v roce 2015, tak i v roce 2018.

Pro vyhodnocení vlivu habitatu na hodnoty  $\alpha$  a  $I_k$  pro všechna získaná data, tj. odděleně pro měření provedená v letech 2015 a 2018 jsem použila jednocestnou ANOVu. Vzhledem k rozdílnému počtu replikátu pro jednotlivé kmeny řas jsem jako vstupní data využila průměry. Využitím průměrů namísto původních dat dojde k jednotnému váhování jednotlivých kmenů.

Pro posouzení změn naměřené hodnoty  $\alpha$  mezi měřeními v letech 2015 a 2018 jsem použila split-plot ANOVu. Vstupní data byla tvořena průměry replikátu pro jednotlivé kmeny řas. Zahrnuty byly pouze kmeny, které byly měřeny jak v roce 2015, tak i v roce 2018. Meziroční změny hodnoty  $I_k$  nebyly vyhodnoceny, vzhledem k nedostatečnému množství naměřených dat.

Pro vyhodnocení vlivu původního habitatu a fáze experimentu na hodnotu maximálního kvantového výtěžku v průběhu experimentu s UV zářením jsem využila jednocestnou dvoucestnou ANOVu. Vstupní data byla ve formě triplikátu pro všechny měřené kmeny, proto data nebyla průměrována. Pro zohlednění různého stavu jednotlivých řas, byla vstupní data normována pomocí maximálního kvantového výtěžku v době zahájení ozařování.

Vliv původního habitatu na rekonvalescenci řas po ozáření UV-A jsem vyhodnotila pomocí jednocestné ANOVy. Vstupní data byla ve formě triplikátů a nebyla průměrována. Data byla normována pomocí maximálního kvantového výtěžku v době zahájení rekonvalescence.

## 5 Výsledky

U většiny kmenů jsem v raných fázích po přeočkování pozorovala bičíkaté buňky oválného až kulatého tvaru. Vyjimkou byly kmeny *Chlamydomonas* sp. (4-b) a *Monoraphidium* sp. (18-z). U *Chlamydomonas* sp. (4-b) jsem zachytila vždy jen shluky bezbičíkatých kulovitých buněk, zatímco kmen *Monoraphidium* sp. (18-z) z antarktického jezera má znatelně menší buňky měsíčkovitého tvaru. Přestože jsou sněžné řasy známe tím, že mají schopnost akumulovat v přírodním prostředí velké množství pigmentů, pouze jezerní kmen *Monoraphidium* sp. (18-z) v průběhu delší kultivace bez přeočkování změnil barvu ze zelené až do oranžové. Ostatní kultury měnily barvu jen nepatrně a většinou přešly pouze ze sytě trávově zeleného do žlutozeleného odstínu.

### 5.1 „Rychlé“ světelné křivky

U všech kmenů jsem určila hodnotu parametru  $\alpha$ . U měření, kde bylo možné z tvaru výsledné křivky spolehlivě odhadnout maximální rETR, tj. došlo v rámci měření k saturaci PSII, jsem určila i hodnoty  $I_k$ .

Protože hlavním cílem bylo stanovit hodnotu parametru  $\alpha$  vypovídající o počátečním sklonu křivky, jsou v následujících grafech uvedeny hodnoty naměřené do desátého kroku měření, tj. intenzity světla  $454 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Při vyšších intenzitách záření docházelo při měření často k velkému kolísání stanovených hodnot rETR kvůli vzniku artefaktů způsobených násobením velmi nízkých kolísajících hodnot efektivního kvantového výtěžku vysokými hustotami toku fotonů.

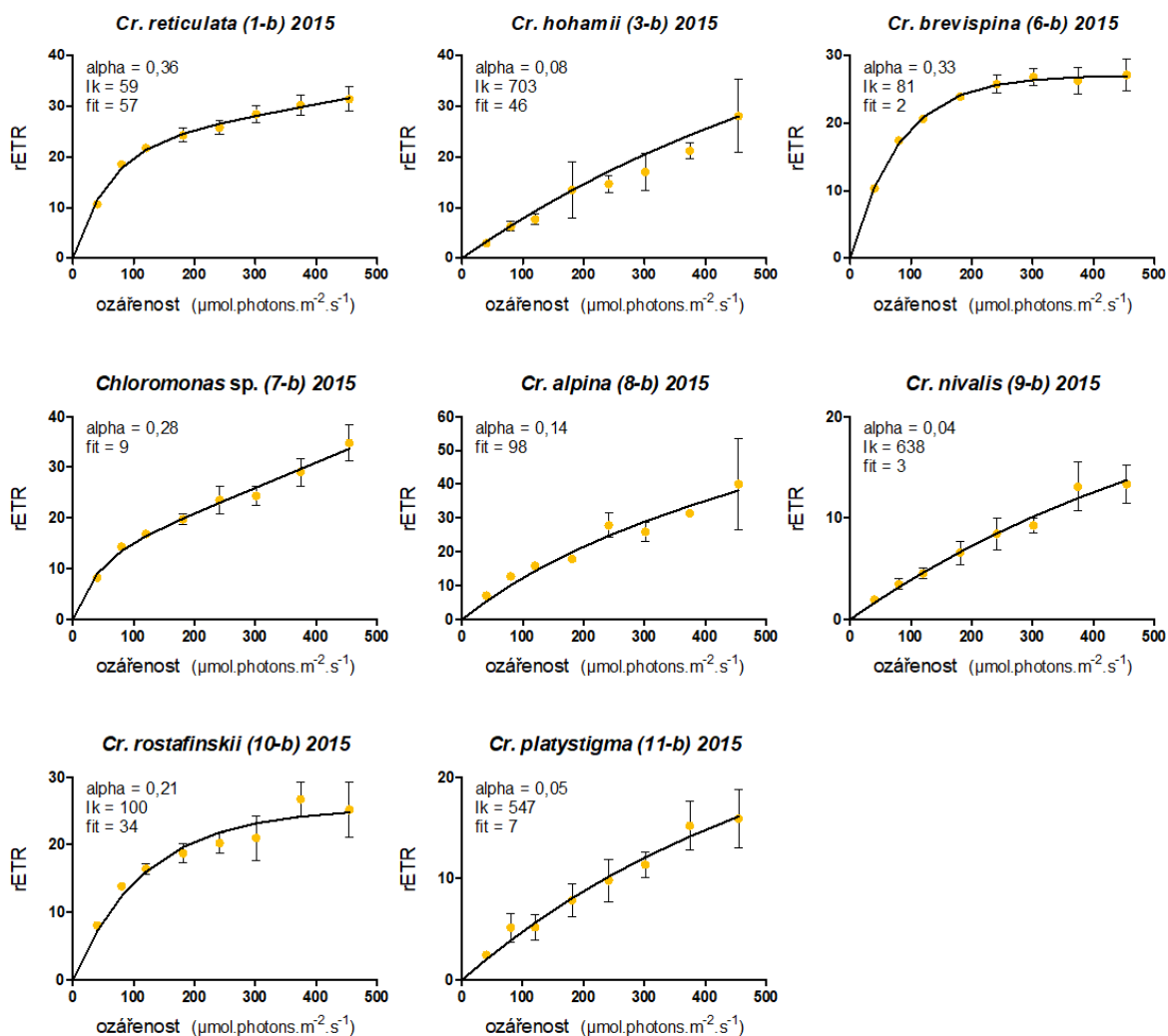
Grafy jsem rozdělila podle data měření (rok 2015 a 2018) a habitatu, odkud původní kmeny pocházely. Výsledky jsou zobrazeny na Obr. 12 (řasy z bezlesých lokalit, 2015), Obr. 13 (řasy z bezlesých lokalit, 2018), Obr. 14 (řasy ze zastíněných lokalit, 2015), Obr. 15 (řasy ze zastíněných lokalit, 2018) a Obr. 16 (jezerní řasy – referenční kmeny). Hodnoty parametrů  $\alpha$  a  $I_k$  a jejich směrodatnou odchylku jsem následně vložila do Tabulky 3 pro srovnání hodnot mezi měřeními v roce 2015 a 2018 a mezi habitaty.

Tabulka 3: Srovnání hodnot  $\alpha$  a  $I_k$  pro studované kmeny mezi měřeními z let 2015 a 2018. Hodnoty, které nebyly měřeny v roce 2015 jsou značeny „-“, hodnoty  $I_k$ , které nebylo možné stanovit „x“.

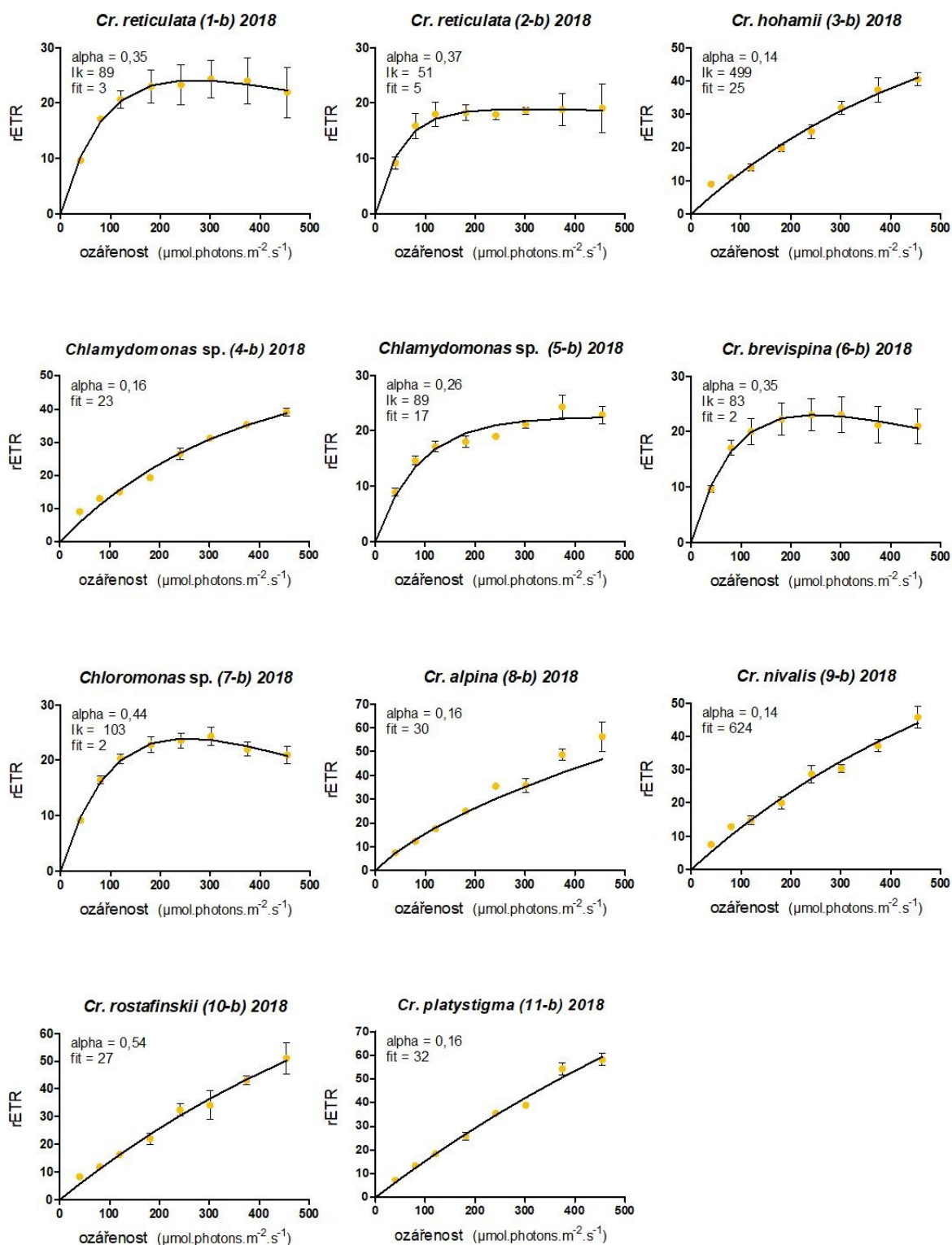
Kmen	Kód	$\alpha$ 2015	$\alpha$ 2018	$I_k$ 2015	$I_k$ 2018
<i>Cr. reticulata</i>	1-b	0,37±0,01	0,35±0,01	59±2	89±16
<i>Cr. reticulata</i>	2-b	-	0,37±0,06	-	51±8
<i>Cr. hohamii</i>	3-b	0,08±0,01	0,14±0,01	703±75	497±19
<i>Chlamydomonas</i> sp.	4-b	-	0,16±0,01	-	x
<i>Chlamydomonas</i> sp.	5-b	-	0,26±0,03	-	89±13
<i>Cr. brevispina</i>	6-b	0,33±0,01	0,35±0,02	80±5	83±8
<i>Chloromonas</i> sp.	7-b	0,28±0,01	0,33±0,01	x	103±4
<i>Cr. alpina</i>	8-b	0,14±0,04	0,16±0,01	x	x
<i>Cr. nivalis</i>	9-b	0,04±0,00	0,14±0,01	638±17	624±17
<i>Cr. rostafinskii</i>	10-b	0,21±0,02	0,15±0,01	123±35	x
<i>Cr. platystigma</i>	11-b	0,05±0,00	0,16±0,08	547±97	x
<i>Chloromonas</i> sp.	12-z	0,38±0,01	0,35±0,03	x	50±11
<i>Cr. rosae</i>	13-z	0,39±0,01	0,39±0,02	69±13	58±6
<i>Cr. tughillensis</i>	14-z	0,38±0,01	0,37±0,01	51±3	73±11
<i>Cr. reticulata</i>	15-z	-	0,20±0,04	-	98±25
<i>Cr. chenangoensis</i>	16-z	0,39±0,01	0,34±0,01	114±34	67±8
<i>Cr. pichincae</i>	17-z	-	0,26±0,02	-	95±29
<i>Monoraphidium</i> sp.	18-z	-	0,13±0,00	-	828±94
<i>Ch. raudensis</i>	19-z	0,29±0,01	0,25±0,01	x	128±7
Ø kmeny z bezlesí		0,19	0,23	355	220
Ø lesní kmeny		0,38	0,32	78	74

Kmeny z roku 2015 z bezlesých stanovišť nedosáhly v žádném měření fotoinhibice, hodnotu  $I_k$  bylo možné stanovit pro *Cr. reticulata* (1-b), *Cr. hohamii* (3-b), *Cr. brevispina* (6-b), *Cr. nivalis* (9-b), *Cr. rostafinskii* (10-b) a *Cr. platystigma* (11-b). Hodnota  $I_k$  se u těchto kmenů pohybovala v rozpětí 59–703  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . U ostatních kmenů nedošlo k dosažení maximální hodnoty rETR a tudíž nebylo možné hodnotu  $I_k$  určit.

Průměrná hodnota  $\alpha$  kmenů z bezlesých stanovišť byla v roce 2015 0,19, přičemž nejvyšší hodnoty dosáhl kmen *Cr. reticulata* (1-b) s hodnotou  $\alpha$  0,37 a nejnižší hodnotu měl kmen *Cr. nivalis* (9-b) s  $\alpha = 0,04$ .



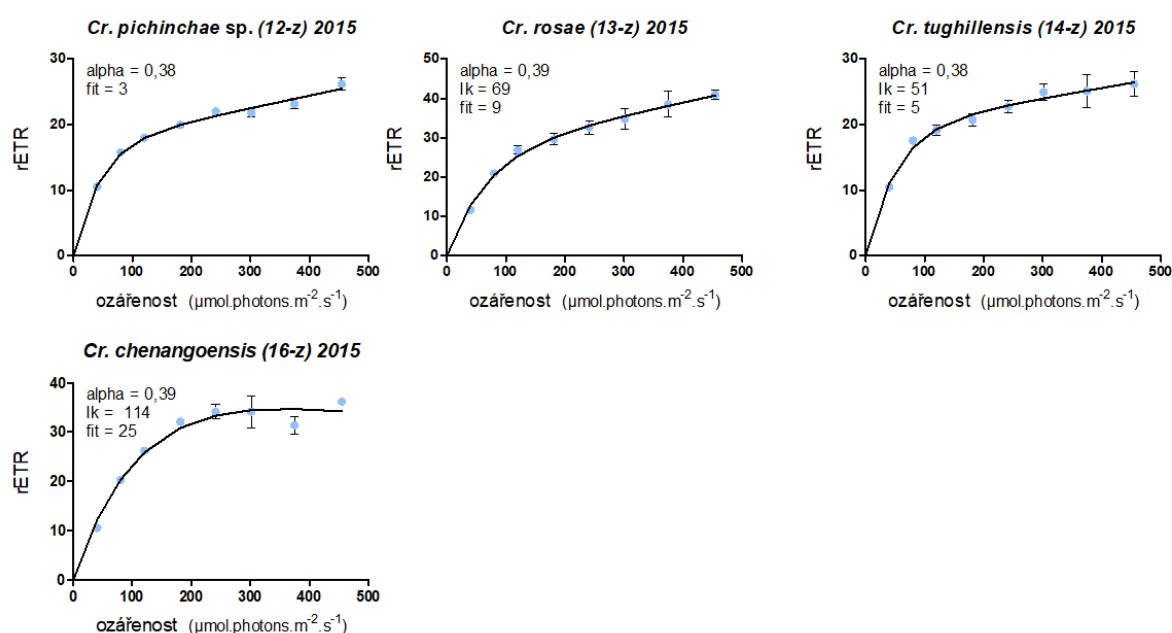
Obr. 12: RLC kmenů sněžných řas z bezlesí, měření 2015.  
Grafy zobrazují vliv intenzity FAR na hodnotu rETR.



Obr. 13: RLC kmenů sněžných řas z bezlesí, měření 2018.  
Grafy zobrazují vliv intenzity FAR na hodnotu  $rETR$ .

Na rozdíl od roku 2015 byl v roce 2018 u kmenů z exponovaných bezlesých stanovišť zaznamenán ve třech případech náznak fotoinhibice. K té došlo u *Cr. reticulata* (1-b), *Cr. brevispina* (6-b) a *Chloromonas* sp. (7-b). Díky tomu u nich bylo možné určit hodnotu  $I_k$ , která se pohybovala v rozmezí intenzit 83–103  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Své maximální aktivity PSII a tudíž možnosti určit hodnotu  $I_k$  dosáhly ještě kmeny *Cr. reticulata* (2-b), *Cr. hohamii* (3-b), *Chlamydomonas* sp. (5-b) a *Cr. nivalis* (9-b), kde se hodnota  $I_k$  pohybovala mezi 51–634  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

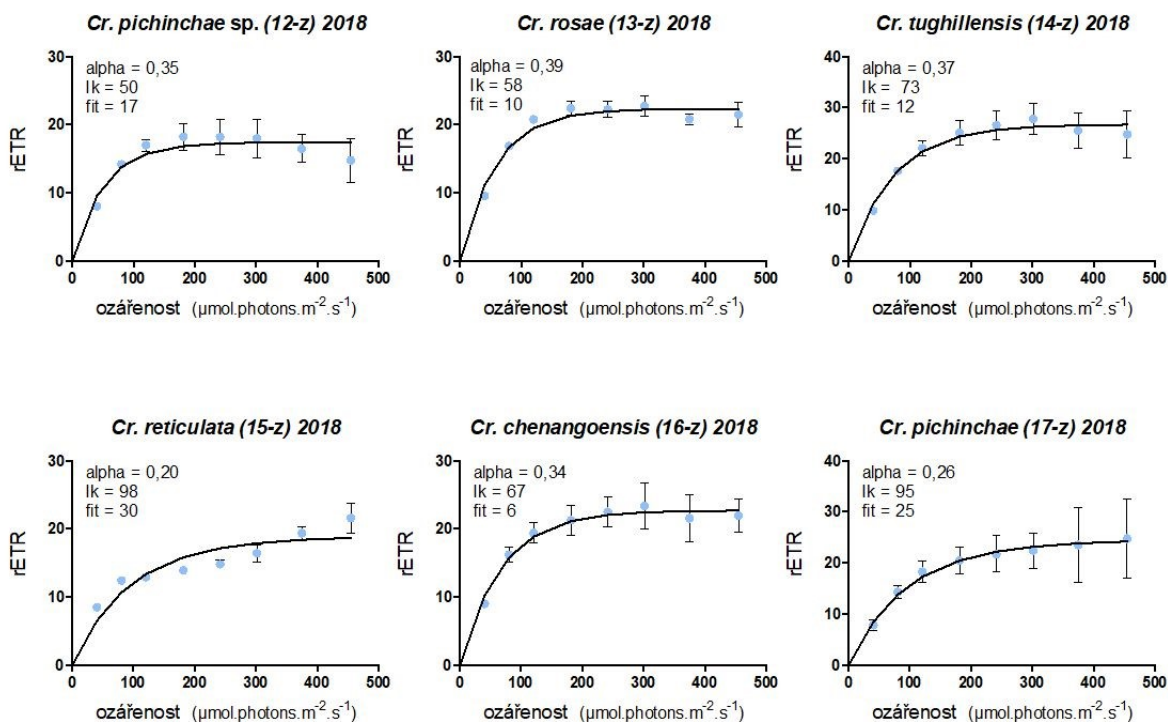
Průměrná hodnota  $\alpha$  u kmenů z bezlesých habitatů byla v roce 2018 0,23. Nejvyšší hodnoty u kmenů z tohoto roku dosáhla *Cr. reticulata* (2-b) s hodnotou  $\alpha$  0,37 a nejnižší pak *Cr. nivalis* (9-b) s  $\alpha$  0,13.



Obr. 14: RLC kmenů sněžných řas ze zastíněných lokalit, měření 2015. Grafy zobrazují vliv intenzity FAR na hodnotu rETR.

U kmenů z roku 2015 ze zastíněných habitatů bylo možné hodnotu  $I_k$  určit pro *Cr. rosae* (13-z) s  $I_k$  69  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , *Cr. tughillensis* (14-z), kde dosáhla hodnoty 51  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a pro kmen *Cr. chenangoensis* (16-z) s hodnotou  $I_k = 114 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . K fotoinhibici u žádného kmene nedošlo.

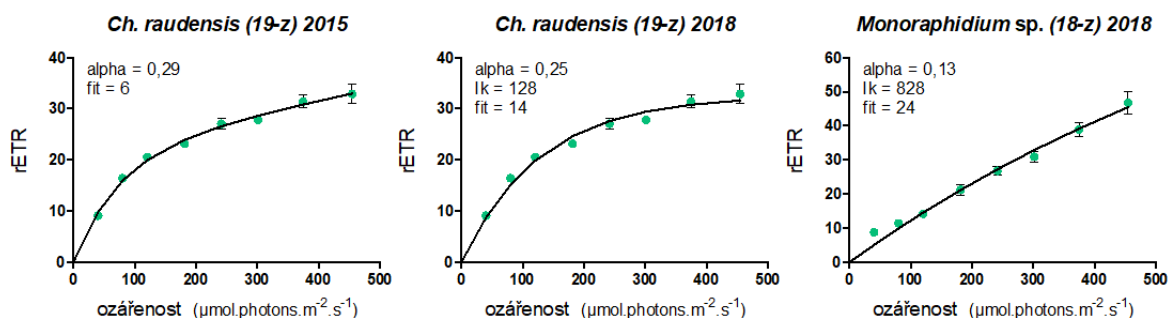
Hodnoty  $\alpha$  se u těchto kmenů pohybovaly ve velmi úzkém rozmezí (0,38–0,39). Nejvyšší hodnoty  $\alpha$  dosáhl kmen *Cr. rosae* (13-z) a *Cr. chenangoensis* (16-z) s  $\alpha$  0,39. Nejnižší hodnota  $\alpha$  pak byla 0,38 u kmenů *Cr. pichinchae* (12-z) a *Cr. reticulata* (15-z).



Obr. 15: RLC kmenů sněžných řas ze zastíněných lokalit, měření 2018. Grafy zobrazují vliv intenzity FAR na hodnotu rETR.

V případě kmenů z lesních habitatů z roku 2018 už bylo možné hodnotu  $I_k$  určit pro všechny kmeny.  $I_k$  se pohybovalo v rozmezí 50–98  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a u žádného kmene nebyla pozorována fotoinhibice.

Hodnota  $\alpha$  pak v průměru byla 0,32 a pohybovala se v rozpětí od 0,20 u kmene *Cr. reticulata* (15-z) a 0,39 u kmene *Cr. rosae* (13-z).



Obr. 16: RLC referenčních kmenů antarktických jezerních řas, měření 2018. Grafy zobrazují vliv intenzity FAR na hodnotu rETR.

Kmen *Ch. raudensis* (19-z) byl použit jako referenční. Nejednalo se o sněžnou řasu, ale o sladkovodní řasu vyizolovanou z trvale zamrzlého antarktického jezera. Ani v jejím případě v roce 2015 nedošlo k fotoinhibici a hodnota  $\alpha$  byla 0,29. Pro rok 2018 pak byly změřeny referenční kmeny dva – oba ze sladkovodního prostředí. U kmene *Ch. raudensis* (19-z) došlo k mírnému poklesu hodnoty  $\alpha$  na 0,25 a hodnota rETR dosáhla svého maxima, tudíž bylo možné určit hodnotu  $I_k$  jako intenzitu  $128 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Hodnoty naměřené na kmenu *Monoraphidium* sp. (18-z) ( $\alpha = 0,13$ ,  $I_k = 828 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) naznačují, že vyžaduje více slunečního záření než *Ch. raudensis* (19-z), ač se jedná o kmen z podobného prostředí.

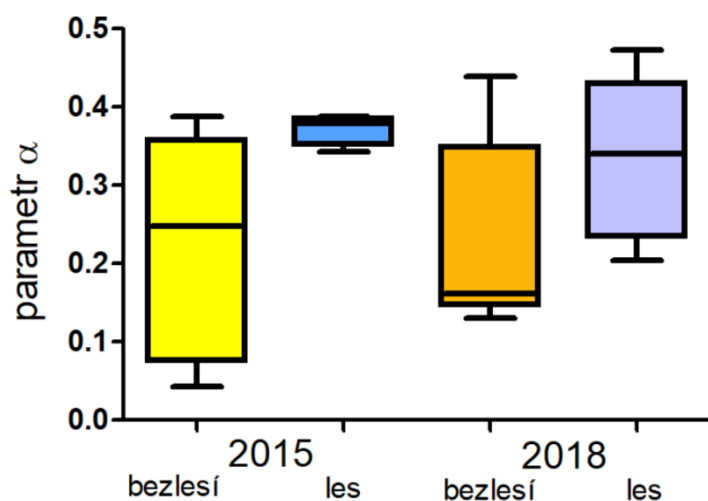
Když jsem kmeny z bezlesých habitatů z obou let porovnála mezi sebou, nejnížší hodnota  $\alpha$  byla v roce 2015 naměřena u kmene *Cr. nivalis* (9-b) a to 0,04, následovaná kmenem *Cr. platystigma* (11-b) s hodnotou 0,05. Nicméně v roce 2018 byly jejich hodnoty  $\alpha$  více než třikrát vyšší než v roce 2015. Nejnížší hodnotu  $\alpha$  v roce 2018 vykazoval opětovně kmen *Cr. nivalis* (9-b), s hodnotou 0,13.

Pro nejvyšší hodnotu z roku 2018 (0,37) toto srovnání bohužel není možné, protože v roce 2015 toto měření u kmene *Cr. reticulata* (2-b) neproběhlo. Z porovnání hodnot zjištěných na kmenu s nejvyšší hodnotou  $\alpha$  v roce 2015 (*Cr. reticulata* (1-b)) je však zřejmé, že k významným změnám nedošlo, neb hodnota  $\alpha$  zůstala stabilní (mírný pokles z 0,37 na 0,35). S výjimkou kmenů *Cr. reticulata* (1-b) a *Cr. rostafinskii* (10-b) došlo u všech kmenů mezi lety 2015 a 2018 k nárůstu hodnoty  $\alpha$ .

U všech kmenů ze zastíněných lokalit zůstala hodnota  $\alpha$  v rozpětí let 2015 a 2018 víceméně stabilní. Největší změna byla zaznamenána u kmenu *Cr. chenangoensis* (16-z), kde došlo ke snížení hodnoty  $\alpha$  z 0,39 na 0,34. U všech kmenů, pro která byla data na srovnání, došlo vždy pouze k mírnějšímu poklesu. Oproti roku 2015 byly u těchto kmenů zaznamenány celkově nižší maximální hodnoty rETR (Obr. 14 a 15).



## 5.2 Statistické vyhodnocení hodnot $I_k$ a $\alpha$



Obr. 17: Porovnání hodnot  $\alpha$  pro kmeny rozdělené podle typu habitatu v letech 2015 a 2018.

Kmeny ze zastíněných lokalit měly hodnotu  $\alpha$  v letech 2015 i 2018 vyšší, než kmeny z bezlesých habitatů, jak ukazují data po vynesení do boxplotů (Obr. 17). Při statistickém vyhodnocení pomocí analýzy rozptylu byla prokázána signifikance vlivu původního habitatu pro měření provedená v roce 2015

( $P = 0,0121$ ), zatímco pro měření z roku 2018 rozdíl signifikantní nebyl ( $P = 0,0795$ ). Při souhrnné

analýze dat z obou let byla role faktoru habitat na hodnotu  $\alpha$  opět signifikantní ( $P = 0,0115$ ) (Tabulky 4, 5). Změny mezi měřeními v letech 2015 a 2018 nebyly statisticky signifikantní (Tabulka 6).

Tabulka 4: Výsledky statistické analýzy hodnot parametru  $\alpha$  pro měření z roku 2015 (ANOVA).

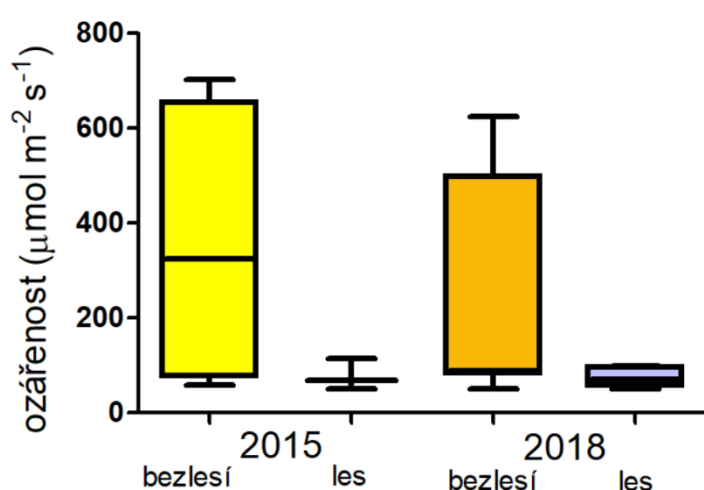
Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl			
Bezlesí 2015	8	1,5038	0,1880	0,0165			
Les 2015	4	1,5330	0,3833	<0,0001			
ANOVA							
Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Střední kvadratická chyba	F	P hodnota	F krit	Signifikance
Mezi výběry	1	0,1017	0,1017	8,8085	0,0141	4,9646	*
Všechny výběry	10	0,1154	0,0115				
Celkem	11	0,2171					

Tabulka 5: Výsledky statistické analýzy hodnot parametru  $\alpha$  pro měření z roku 2018 (ANOVA).

Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl			
Bezlesí 2018	11	2,5575	0,2325	0,0098			
Les 2018	6	1,9140	0,3190	0,0049			
ANOVA							
Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Střední kvadratická chyba	F	P hodnota	F krit	Signifikance
Mezi výběry	1	0,0291	0,0291	3,5390	0,0795	4,5431	.
Všechny výběry	15	0,1231	0,0082				
Celkem	16	0,1522					

Tabulka 6: Výsledky statistické analýzy hodnot parametru  $\alpha$  pro měření z let 2015 a 2018 (split-plot ANOVA).

	Stupně volnosti	Suma čtverců	Průměrný čtverec	F hodnota	P hodnota	Signifikance
Habitat	1	0.1684	0.1684	10	0.0115	*
Reziduální	9	0.1515	0.0168			
Rok	1	0.0006	0.0006	0.425	0.531	ne
Rok:habitat	1	0.0030	0.0030	2.199	0.172	ne
Reziduální	9	0.0125	0.0014			



Obr. 18: Porovnání hodnot  $I_k$  pro kmeny rozdělené podle typu habitatu v letech 2015 a 2018.

Hodnota  $I_k$  měla u kmenů z bezlesých stanovišť velký rozptyl, který se v průběhu tří let mírně snížil, stejně jako průměrná hodnota. U kmenů ze zastíněných habitatů byla hodnota  $I_k$  v obou letech nízká a nepřesáhla hodnotu  $114 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Obr. 18). Vzhledem k malému množství vstupních dat nebyla prokázána signifikance

rozdílu mezi kmeny z bezlesých a stinných lokalit v jednotlivých letech. Pro souhrnné vyhodnocení jsem dále použila hodnoty  $I_k$  pro kmeny, kde byla data alespoň z jednoho měření. U kmenů, pro které byla určena hodnota  $I_k$  v obou letech jsem do statistiky použila průměr těchto hodnot. Ani při vyhodnocení těchto dat pomocí ANOVy se však neprokázala signifikance vlivu habitatu na hodnotu  $I_k$  ( $P = 0,1203$ ) (Tabulka 7).

Tabulka 7: Výsledky statistické analýzy hodnot parametru  $I_k$  pro průměrné hodnoty měření z let 2015 a 2018 (ANOVA).

Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl			
Ø Bezlesí	9	2278	253	65641			
Ø Les	6	460	77	414			
ANOVA							
Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Střední kvadratická chyba	F	P hodnota	F krit	Signifikance
Mezi výběry	1	112113	112113	2,7645	0,1203	4,6672	není
Všechny výběry	13	527201	40554				
Celkem	14	639314					

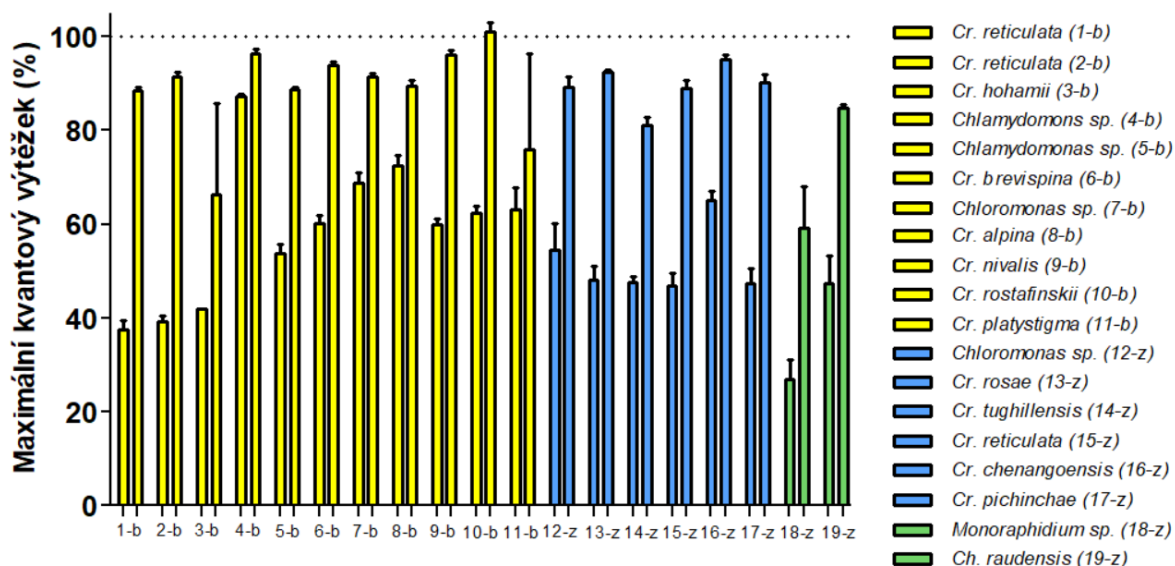
### 5.3 Srovnání vlivu UV záření u jednotlivých kmenů

Ve druhé části práce jsme sledovali stresovou reakci jednotlivých kmenů indukovanou UV-A zářením a následnou efektivitu jejich rekonvalescence. Pro srovnání jsme použili hodnotu naměřeného maximálního kvantového výtěžku, který funguje jako dobrý ukazatel míry stresu.

U kmenů z bezlesých habitatů došlo při vystavení UV záření ke snížení maximálního kvantového výtěžku na 37,5–87,2 % z hodnoty naměřené před expozicí (Obr. 19). Z tohoto hlediska byl nejodolnějším kmenem *Chlamydomonas* sp. (4-b), u kterého došlo jen k mírnému poklesu maximálního kvantového výtěžku z 0,65 na 0,57. Naopak u *Cr. reticulata* (1-b) došlo z kmenů z bezlesí, jako, k největšímu propadu hodnoty maximálního kvantového výtěžku a to z 0,75 na 0,28. U kmenů ze zastíněných lokalit byl pokles maximálního kvantového výtěžku ještě zřetelnější. Nejodolnějším z kmenů z lesních lokalit poklesl maximální kvantový výtěžek na 65 % z původní hodnoty (0,75 na 0,49) – jednalo se o *Cr. chenangoensis* (16-z). Nejcitlivějším kmeni – *Cr. reticulata* (15-z) – pak na 47 % původní hodnoty, tzn. z 0,73 maximální kvantový výtěžek klesl na 0,34. Absolutní hodnoty

maximálního kvantového výtěžku jsou zaneseny v Tabulce 8. Porovnání vývoje relativních hodnot maximálního kvantového výtěžku během měření pro jednotlivé kmeny je na Obr. 19.

Průměrná hodnota maximálního kvantového výtěžku pro kmeny z bezlesí před zahájením experimentu byla 0,70. U kmenů ze stinných lokalit 0,73. Po vystavení UV-A



Obr. 19: Relativní hodnoty maximálního kvantového výtěžku. Pro každý kmen je uvedena hodnota po 24 hodinové expozici UV-A záření a po dalších 24 hodinách bez UV-A záření. Kmeny ze zastíněných lokalit jsou označeny modře. Kmeny z bezlesých lokalit jsou značeny žlutě. Zeleně jsou značeny referenční kmeny. Hodnoty jsou vztaheny k hodnotám  $F_v/F_m$  před inkubací v UV (100 %).

záření hodnota  $F_v/F_m$  v průměru klesla u kmenů z bezlesí na 0,41 a u kmenů z lesa na 0,37. Po rekonvalescenci průměrná hodnota maximálního kvantového výtěžku vystoupala na 0,64 u kmenů z bezlesí a 0,63 u kmenů ze zastíněných lokalit (Tabulka 7).

Tabulka 8: Absolutní hodnoty maximálního kvantového výtěžku se směrodatnými odchylkami pro jednotlivé kmeny – před zahájením pokusu s UV-A zářením, po 24 hodinách expozice UV-A záření a po 24 hodinách rekonvalescence bez UV-A záření.

Kmen	Kód	před UV	24h UV	24h po UV
<i>Chloromonas reticulata</i>	1-b	0,75±0,01	0,28±0,03	0,66±0,01
<i>Chloromonas reticulata</i>	2-b	0,75±0,01	0,29±0,02	0,68±0,01
<i>Chloromonas hohamii</i>	3-b	0,69±0,01	0,29±0,00	0,46±0,19
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Moewusii - clade, clade "B")	4-b	0,65±0,02	0,57±0,01	0,63±0,01
<i>Chlamydomonas</i> sp. (Stephanosphaera -clade, clade "C")	5-b	0,74±0,01	0,40±0,03	0,65±0,00
<i>Chloromonas brevispina</i>	6-b	0,75±0,01	0,45±0,02	0,71±0,01
<i>Chloromonas</i> sp.	7-b	0,77±0,01	0,53±0,03	0,70±0,01
<i>Chloromonas alpina</i>	8-b	0,70±0,01	0,51±0,03	0,63±0,01
<i>Chloromonas nivalis</i>	9-b	0,66±0,02	0,40±0,02	0,64±0,01
<i>Chloromonas rostafinskii</i>	10-b	0,65±0,02	0,40±0,02	0,65±0,02
<i>Chloromonas platystigma</i>	11-b	0,52±0,01	0,33±0,04	0,40±0,15
<i>Chloromonas</i> sp. ("SA"-clade, "A2"-clade)	12-z	0,76±0,01	0,42±0,07	0,68±0,02
<i>Chloromonas rosae</i> var. <i>psychrophila</i>	13-z	0,71±0,01	0,34±0,04	0,65±0,00
<i>Chloromonas tughillensis</i>	14-z	0,74±0,01	0,35±0,02	0,60±0,02
<i>Chloromonas reticulata</i>	15-z	0,73±0,01	0,34±0,04	0,65±0,02
<i>Chloromonas chenangoensis</i>	16-z	0,75±0,01	0,49±0,03	0,72±0,01
<i>Chloromonas pichinchae</i>	17-z	0,75±0,01	0,35±0,04	0,67±0,02
<i>Monoraphidium</i> sp.	18-z	0,65±0,02	0,18±0,05	0,39±0,08
<i>Chlamydomonas raudensis</i>	19-z	0,74±0,02	0,35±0,08	0,63±0,01
Ø kmeny z bezleší		0,69	0,40	0,62
Ø kmeny z bezleší		0,74	0,38	0,66

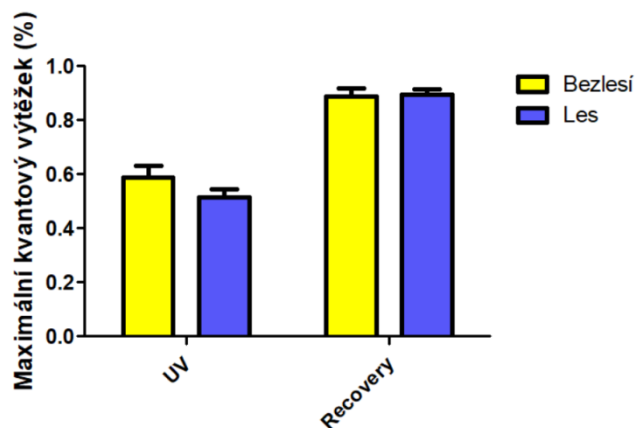
Z výsledků je zřejmé, že UV-A záření mělo negativní vliv na maximální kvantový výtěžek – tedy na míru funkčnosti PSII všech studovaných kmenů. Nicméně doba expozice 24 hodin pro řasy evidentně nebyla fatální a po dalších 24 hodinách hodnota maximálního kvantového výtěžku u všech kmenů opětovně vzrostla až na hodnoty blížíící se 100 % hodnot původních (Obr. 19, 20). I v případě velkých poklesů maximálního kvantového výtěžku (u *Cr. reticulata* (1-b) na 0,28±0,03 a u *Monoraphidium* sp. (18-z) 0,18±0,05) po došlo ukončení působení UV-A záření k opětovnému nárustu maximálního kvantového výtěžku (*Cr. reticulata* (1-b) 0,66±0,01 a *Monoraphidium* sp. (18-z) 0,39±0,08).

## 5.4 Statistické vyhodnocení vlivu habitatu na odolnost vůči UV-A a následnou rekonvalescenci

Data ukazující vliv UV-A záření a míru následné rekonvalescence jednotlivých kmenů byla rozdělena podle habitatu. Referenční kmeny do tohoto vyhodnocení zahrnuty nebyly. Rozdíly mezi kmeny z bezlesí a zastíněných habitatů jsou shrnuty na Obr. 20.

Statistické vyhodnocení testem ANOVA prokázalo vliv UV-A záření i následné rekonvalescence na fotosyntetické charakteristiky testovaných kmenů sněžných řas ( $P < 0,0001$ ) (Tabulky 9, 10)

Data naznačují, že sněžné řasy vyizolované z bezlesí snáší ultrafialové záření lépe než kmeny ze zastíněných lokalit. Při vyhodnocení testem ANOVA se prokázalo, že kmeny ze stinných lokalit mají signifikantně nižší odolnost vůči dané intenzitě UV-A ( $P = 0,0457$ ) (Tabulka 11). V efektivitě rekonvalescence mezi řasami ze zastíněných a bezlesých lokalit ale signifikantní rozdíl pozorován nebyl ( $P = 0,3085$ ) (Tabulka 12).



Obr. 20: Srovnání vlivu UV-A a rekonvalescence na sněžné řasy podle typu habitatu. Hodnoty byly normalizovány k hodnotě před expozicí UV-A záření (100 %).

Tabulka 9: Negativní vliv UV-záření na maximální kvantový výtěžek

Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl			
untreated	51	36,19	0,7096	0,0037			
UV-A treat	51	20,21	0,3963	0,0079			
ANOVA							
Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Střední kvadratická chyba	F	P hodnota	F krit	Signifikance
Mezi výběry	1	2,5035	2,5035	430,8	<0,0001	3,9361	***
Všechny výběry	100	0,5812	0,0058				
Celkem	101	3,0847					

Tabulka 10: Pozitivní vliv rekonvalescence na maximální kvantový výtěžek

Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl			
UV-A treat	51	20,21	0,3963	0,0079			
rekonvalescence	51	33,03	0,6476	0,0028			
ANOVA							
Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Střední kvadratická chyba	F	P hodnota	F krit	Signifikance
Mezi výběry	1	1,6113	1,6113	300,3	<0,0001	3,9361	***
Všechny výběry	100	0,5365	0,0054				
Celkem	101	2,1478					

Tabulka 11: Srovnání vlivu původního habitatu na odolnost vůči UV-A záření

Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl			
Bezlesí	31	18,4317	0,5946	0,0226			
Les	18	9,2809	0,5156	0,0067			
ANOVA							
Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Střední kvadratická chyba	F	P hodnota	F krit	Signifikance
Mezi výběry	1	0,0710	0,0710	4,2137	0,0457	4,0471	*
Všechny výběry	47	0,7921	0,0169				
Celkem	48	0,8631					

Tabulka 12: Srovnání vlivu původního habitatu na schopnost rekonvalescence

Výběr	Počet	Součet	Průměr	Rozptyl			
Bezlesí	31	51,3340	1,6559	0,1764			
Les	18	31,7862	1,7659	0,0479			
ANOVA							
Zdroj variability	Stupně volnosti	Suma čtverců	Střední kvadratická chyba	F	P hodnota	F krit	Signifikance
Mezi výběry	1	0,1377	0,1377	1,0599	0,3085	4,0471	ne
Všechny výběry	47	6,1063	0,1299				
Celkem	48	6,2440					

## 6 Diskuze

Podmínky, ve kterých sněžné řasy žijí, jsou extrémní z mnoha různých pohledů, ať už jde o nízkou teplotu, problémy s dostupností kapalně vody či nedostatek živin. Nejvýraznějším a na prvním pohled patrným faktorem je však sluneční záření, jehož intenzita může v průběhu životního cyklu sněžných řas kolísat od velmi nízkých do extrémně vysokých hodnot (Gorton et al., 2001, Hoham and Duval, 2001). Sluneční energie je pro fotosyntetizující organismy nezbytná, nicméně v případě jejího nedostatku i nadbytku dochází k mnohým problémům nejčastěji spojeným právě s fotosyntetickým aparátem. Proto je pro sněžné řasy nezbytně nutné využívat širokou škálu strategií umožňující jim dlouhodobě přežít v takto extrémních podmínkách (Leya 2013). Ačkoliv sněžné řasy představují z výše uvedených důvodů vhodný modelové organismy pro studium adaptací fotosyntetického aparátu na extrémní podmínky prostředí, jsou jejich fotosyntetické charakteristiky prostudovány jen u omezeného množství druhů a data pochzejí většinou z terénních měření (např. Remias et al., 2005, 2010a, Kvíderová, 2010, Procházková et al., 2018a,b).

### **6.1 Reakce fotosyntetické aktivity sněžných řas na různé intenzity FAR**

Jedním z cílů této práce bylo porovnat reakce a rezistenci na různé intenzity slunečního záření u kmenů vyizolovaných z exponovaných sněhových polí v bezlesí a u kmenů pocházejících ze zastíněných lokalit. Intenzita slunečního záření se může značně lišit v závislosti na habitatu, denní době, nadmořské výšce, zeměpisné šířce a v případě sněžných řas žijících v hlubších vrstvách sněhové pokrývky také v závislosti na její tloušťce a kvalitě (Laybourn-Parry et al., 2012).

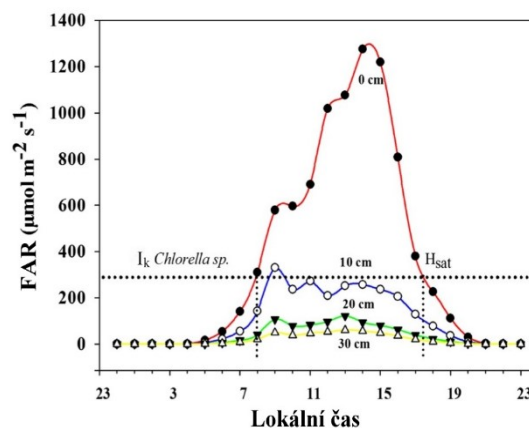
#### **6.1.1 Intenzita FAR v přirozených podmínkách a během laboratorního experimentu**

Intenzita slunečního záření měřená na povrchu sněhu v alpínském pásu v Krkonoších se pohybovala od 85 do 1908  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Kvíderová, 2010). Při jarním měření ve stejném pohoří se průměrné hodnoty v zastíněných lokalitách pohybovaly okolo 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a v exponovaných lokalitách byla naměřena průměrná hodnota 208  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . V polozastíněných habitatech se pak hodnoty pohybovaly kolem 84  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Nedbalová et al., 2008). Při měření v bezlesých oblastech rakouských Alp se intenzita slunečního záření pohybovala v rozmezí 50–1800  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Remias et al., 2005). Při měření ve Skalistých horách (USA) ve výšce 3250 m n. m. byly intenzity za slunečných dnů i přes 3000  $\mu\text{mol m}^{-2}$



s<sup>-1</sup>, zatímco za bouří klesala intenzita FAR i přes poledne na méně než 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Gorton et al., 2001). Na antarktickém ostrově Krále Jiřího se hodnoty pohybovaly mezi 153 a 1276  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a během oblačných dní byly výrazně nižší a nepřesáhly hodnotu 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Rivas et al., 2016), nicméně intenzita krom oblačnosti závisela i na denní době a úhlu dopadu slunečního záření (Obr. 21). Výše uvedeným hodnotám zhruba odpovídá i rozmezí, v jakém byly řasy testovány v této práci na PAM fluorometru, kde nejslabší záblesk měl intenzitu 40  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a nejsilnější 2008  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Parametry RLC byly stanoveny z počáteční části křivek – do hodnoty 454  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , což je intenzita pohybující se někde mezi maximální hodnotou z ostrova Krále Jiřího a zhruba průměrnou intenzitou záření v Krkonoších (Kvíděrová, 2010).

Intenzita FAR v inkubátoru, kde byly řasové kmeny dlouhodobě kultivovány (~ 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), byla ve srovnání s hodnotami použitými při kultivaci kmene *Chlorella* sp., téměř čtyřikrát vyšší (Rivas et al., 2016), byť stále je to jen polovina intenzity záření při prvním měřicím záblesku na PAM. Hodnota 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  je ve srovnání s podmínkami v terénu značně nízká, nicméně sněžné řasy mohou migrovat v profilu sněžové pokrývky, a tak významně snižovat svoji expozici záření. Při měření míry penetrace světla sněžovou pokrývkou byly hodnoty okolo 20  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  naměřeny v hloubce 20 cm. Například při intenzitě slunečního záření v oblasti FAR 740  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  byla v této hloubce naměřena intenzita pouhých 18  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Rivas et al., 2016). Obdobné snížení intenzity v hlubších vrstvách sněžové pokrývky ukázalo i měření ze Skalistých hor, ve kterém kromě změny intenzity celkového FAR měřili i změny intenzit v jednotlivých částech spektra FAR ve vertikálním profilu sněhu (Gorton et al., 2001). Při měření v Alpách a Krkonoších sněžné řasy migrovaly pouze do hloubky 6–10 cm pod povrch



Obr. 21: Intenzita FAR v závislosti na hloubce ve sněžové pokrývce a denní době.

V grafu je vynesena také hodnota  $I_k$  naměřená pro kmen řasy *Chlorella* sp., izolovaný z téže lokality (ve skutečnosti se podle obrazové dokumentace v článku patrně jedná o sněžnou řasu z řádu *Chlamydomonadales* – *L. Nedbalová, os. sdělení*). Je patrné, že zatímco na povrchu dosahuje světlo dostatečné intenzity pro saturaci PSII téměř 13 hodin, v hlubších vrstvách je tento čas výrazně snížen nebo není saturace PSII dosaženo vůbec. Měřeno na ostrově Krále Jiřího (Antarktida). (upraveno podle Rivas et al., 2016).

sněhové pokrývky, kde by za stejných podmínek byly hodnoty intenzity adekvátně vyšší (Remias et al., 2005; Kvíderová, 2010). Lze tedy říci, že intenzita FAR při dlouhodobé kultivaci v laboratoři odpovídala zhruba podmínkám, ve kterých se řasy vyskytují po migraci pod povrch sněhové pokrývky za částečně oblačného dne.

### 6.1.2 Vliv původního habitatu na fotosyntetické charakteristiky řas

Dobrým nástrojem pro porovnání fotosyntetických charakteristik sněžných řas jsou RLC křivky znázorňující vztah aktivity PSII a rostoucí intenzity záření. Lze z nich mimo jiné vyčíst, za jakých intenzit FAR došlo k případné saturaci či fotoinhibici PSII. Z těchto křivek lze určit dva parametry, charakterizující fotosyntetické vlastnosti řas za různých intenzit FAR. Prvním z nich je parametr  $I_k$ , který odpovídá minimálnímu saturačnímu ozáření (Ralph and Gademann, 2005), druhým pak parametr  $\alpha$ , který charakterizuje efektivitu využívání nízkých intenzit FAR (Nielsen and Jørgensen, 1968).

Předpokládala jsem, že sněžné řasy z bezlesých habitatů budou mít nižší hodnotu  $\alpha$ , protože budou adaptované na vyšší intenzitu slunečního záření, zatímco kmeny z lesních habitatů zareagují rychleji na růst FAR a bude jim stačit nižší intenzita světla k efektivní fotosyntéze. Tomu odpovídají výsledky z let 2015 i 2018, kde průměrná hodnota parametru  $\alpha$  u kmenů z bezlesí byla v roce 2015 0,19 a v roce 2018 0,22, zatímco u kmenů z lesních habitatů byla průměrná hodnota tohoto parametru 0,38, resp 0,36. Sněžným řasám z bezlesí se v tomto ohledu blíží i jiné taxonomické skupiny psychrofilních řas z exponovaných lokalit, například pro ledovcové řasy z třídy Zygnematophyceae z Grónska byla naměřena hodnota kolem 0,25 (intenzita slunečního záření se zde za jasných dní pohybovala kolem  $1716 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Yallop et al., 2012). Relativně nízká hodnota  $\alpha$  byla naměřena i u *Chlainomonas* sp., kdy pro populaci tohoto druhu ve Vysokých Tatrách dosahovala hodnoty 0,19 a v Alpách 0,12. To poukazuje na možnou variabilitu v rámci jednoho druhu v závislosti na podmínkách prostředí. Fotoinhibice nastala v obou případech kolem  $1300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Naopak u řasy červeného sněhu, *Ch. nivalis*, fotoinhibice začínala až při  $2000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a lze tedy říci, že tento druh lépe snáší vysokou intenzitu slunečního záření. Přitom hodnota  $\alpha$  byla vyšší než u *Chlainomonas* sp. a pohybovala se kolem hodnoty 0,24 (Procházková et al., 2018b). Hodnoty kolem 0,2 byly zjištěny i pro druh *Cr. nivalis*, respektive *Cr. nivalis* subsp. *tatrae* (Remias et al. 2010a, Procházková et al., 2018a). Ve všech případech se však jednalo o měření terénních vzorků cyst. Průměrné hodnoty naměřené v rámci této práce na laboratorních kmenech sněžných řas z bezlesí z obou let se pohybuji

mezi těmito čísly (s výjimkou kmenů *Cr. reticulata*). Hodnoty pro kmeny z lesních lokalit nejsou pro srovnání k dispozici.

Pokud jde o referenční kmeny, jejich hodnoty  $\alpha$  se navzdory podobnému typu habitatu dost lišily, nicméně nijak nevybočovaly z rozmezí hodnot zjištěných pro sněžné řasy. Každopádně srovnání naměřených hodnot pro *Ch. nivalis* a *Chlainomonas* sp. ukazuje, že hodnota  $\alpha$  sama o sobě nestačí pro komplexní zhodnocení odpovědi na různé světelné podmínky a pro odhad odolnosti vůči vysokým intenzitám FAR je nutné zhodnotit i celkový tvar RLC.

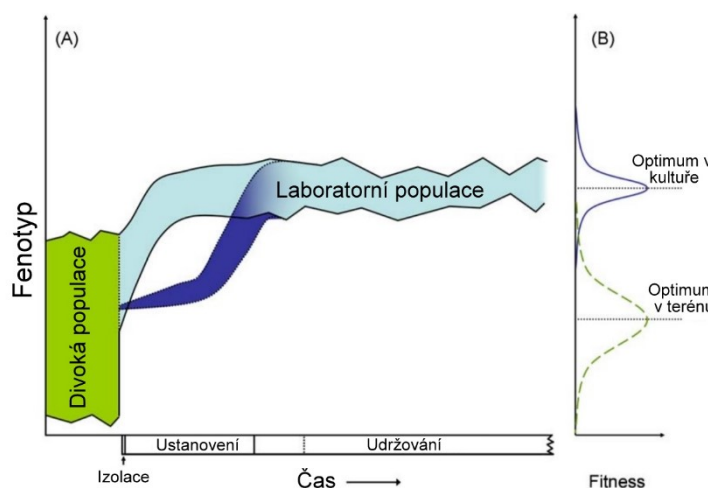
### 6.1.3 Stabilita fenotypu v rámci dlouhodobé kultivace

Výše zmíněné rozdíly v parametrech RLC mezi habitaty naznačily, že tyto vlastnosti zůstávají zachovány i během dlouhodobé kultivace v laboratorních podmínkách. V rámci této práce bylo možné navíc provést porovnání vlastností některých konkrétních kmenů v letech 2015 a 2018. Statistické vyhodnocení dat neprokázalo signifikantní posun v průběhu těchto tří let. Hodnoty  $I_k$  pro porovnání využity nebyly z důvodu malého množství dat.

Tyto výsledky nejsou příliš překvapivé, protože třetina kmenů z bezlesých habitatů pochází původně ze sbírky CCCryo, kde jsou udržovány v umělých podmínkách již od roku 1999 ([www.cccryo.fraunhofer.de](http://www.cccryo.fraunhofer.de)). Mezi jejich izolací a prvním měřením pro tuto práci tedy uplynulo 16 let. Ve sbírce CCCryo byly kultivovány při teplotě 2 °C, v naší laboratoři pak při teplotě mezi 4–8 °C. Všechny řasy ze sbírky UTEX použité v této práci byly kultivovány při 5 °C a do této sbírky se dostaly v mezi lety 1977–1999. Řasy z naší sbírky byly izolovány mezi rokem 2002 a 2012. Heterogenita ve stáří jednotlivých kmenů v této práci je tedy obrovská a pohybuje se (počítáno k roku 2015) mezi stářím 3–38 let.

Tyto výsledky samozřejmě nevypovídají o tom, zda k nějakým změnám došlo v období po izolaci kmenů do laboratorních linií. Současně nelze vyloučit, že ke změnám dochází i při dlouhodobé kultivaci. Ostatně u třídy Chlorophyceae byly pozorovány adaptace na různá kultivační média (Lakeman et al., 2009) a obdobně lze očekávat i adaptace na různé další parametry laboratorních podmínek, jako jsou intenzita záření nebo teplota.

Stabilita fenotypu řas je zajímavá nejen s ohledem vědecké poznání, ale i s ohledem na biotechnologie a potenciální využití řasových kmenů v nejrůznějších průmyslových odvětvích. Pokud však u řas dochází k posunu fenotypu, čemuž nasvědčuje například soubor prací shrnutých v práci z roku 2009 (Lakeman et al., 2009) (Obr. 22), vyvstávají otázky, jak dlouho se jejich vlastnosti mohou měnit i ve sbírkách, které všechny parametry tyto změny vyvolávají a nakolik jsou významné. Mé výsledky pak ukazují, že ke změnám, které by vedly k výraznějšímu posunu fotosyntetických parametrů během sledovaného období nedošlo a po adaptaci na životní podmínky při laboratorní kultivaci už zůstává v tomto ohledu fenotyp kultivovaných sněžných řas relativně stabilní.



Obr. 22: Vliv dlouhodobé kultivace populace v laboratorních podmínkách na fenotyp (Upraveno podle Lakeman et al., 2009).

## 6.2 Vliv UV-A záření na stresovou reakci kmenů

### 6.2.1 Toxicita UV záření a ochranné mechanismy

Výzkum vlivu UV záření je zajímavý z mnoha důvodů nejen ve specifickém případě sněžných řas. Objasnění jeho vlivu na živé organismy nám může pomoci ve vývoji látek, chránících před jeho škodlivými dopady. Ty jsou ještě znásobeny v místech s ozonovou dírou. Současně je zajímavé porovnat některé dnešní poznatky s představami, jak to na Zemi vypadalo dříve. V minulosti se totiž organismy museli vypořádat s mnohem větší intenzitou UV záření – zvláště v raném prekambriu (Garcia-Pichel and Castenholz, 1991).

UV-A záření má vlnovou délku v rozpětí 315–400 nm a ze skupiny UV záření je nejméně nebezpečné. S výjimkou malé části blízko rozhraní UV-A a viditelného spektra není UV záření využitelné pro fotosyntézu a jde tedy o složku slunečního záření, se kterou se fotoautotrofní organismy musí vypořádat a chránit se před jejími účinky, tedy se přizpůsobit, tolerovat ho, a nebo se mu vyhnout (Larkum and Wood, 1993).

Mezi hlavní příčiny toxicity UV záření patří jeho schopnost indukovat vznik ROS. To má dopad především na kvalitu semiautonomních organel, a dále pak způsobuje poškození nukleových kyselin, proteinů i lipidů (Sharma et al., 2012). Například výzkum vlivu UV záření na řasy ze třídy Florideophyceae ukázal, že expozice UV-A a UV-B vede k oddělení a oddálení tylakoidů už po dvou hodinách a při měření po čtyřech hodinách ozáření se tento jev ještě prohloubil. Po šesti hodinách ozáření následně docházelo k dalším strukturním změnám, vedoucím až ke ztrátě organizovanosti uvnitř chloroplastů. K podobným změnám docházelo i na mitochondriální úrovni. Oproti tomu na jádře, endoplasmatickém retikulu ani Golgiho aparátu nebyly změny zaznamenány. Všechny zaznamenané změny však byly vratné a už 23 hodin od UV-A a UV-B ozáření docházelo k regeneraci struktur organel do původního stavu (Pope et al., 2003).

Řasy se před UV zářením chrání různými způsoby – vertikálním pohybem ve vodním sloupci, resp. ve sněhovém profilu (Smith et al., 1992, Hoham and Duval, 2001), zefektivněním oprav DNA, akumulací antioxidantů (Duval et al., 1999, Sharma et al., 2012), nebo pomocí fotoprotektivních pigmentů (Cardozo et al., 2011, Remias et al., 2012). Nejznámější fotoprotektivní pigment je karotenoid astaxantin a velice efektivní jsou i látky fenolové podstaty jako například purpurogalinová karboxylová kyselina-6-O- $\beta$ -D-glukopyranosidu (Remias et al., 2012), nebo také mykospirinové aminokyseliny (MAAs) (Cardozo et al., 2011). O něco slabší ochranné vlastnosti má pak sporopolenin (Xiong et al., 1997). K ochraně před nadměrným zářením včetně UV složky přispívají i anorganické částice bohaté na Si, Fe a Al, které jsou často pozorovány na povrchu hypnoblástů *Ch. nivalis* (Lütz-Meindl and Lütz, 2006). Všechny tyto mechanismy jsou sněžnými řasami v různé míře využívány.

U sněžné řasy *Ch. nivalis* byl při vystavení UV-B záření o intenzitě  $0,14 \text{ mW cm}^{-2}$  prokázán nárůst množství chlorofylu a sekundárních karotenoidů. Ač je toto záření agresivnější než UV-A, tato sněžná řasa přežila inkubaci bez morfologického poškození, došlo pouze snížení rychlosti fotosyntézy (produkce kyslíku). Podobný jev byl pozorován i u arktické půdní řasy *Tetracystis* sp. (Remias et al., 2010b). Oproti tomu u arktických a antarktických kmenů z rodu *Zygnema* došlo po ozáření  $0,322 \text{ mW cm}^{-2}$  UV-A a  $0,002 \text{ mW cm}^{-2}$  UV-B k poškození mitochondrií a chloroplastů, což vedlo ke snížení efektivního

kvantového výtěžku. Tyto kmeny využívají pro ochranu před UV výše zmíněné fenolické látky, které akumulují ve vakuolách a cytoplasmatických těliscích (Pichrtová et al., 2013).

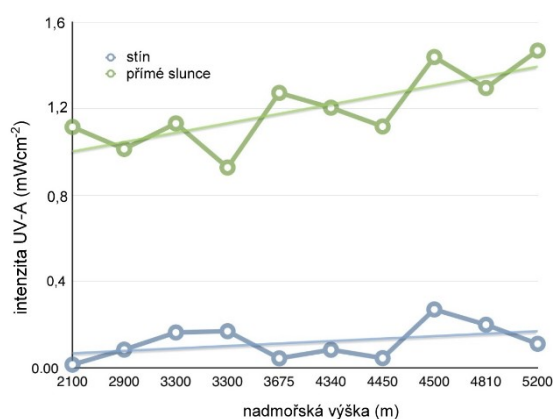
Rozdíly v míře poškození sněžných řas vlivem UV záření byly pozorovány i napříč vzorky z různých habitatů. Zatímco červené sněhy z bezlesých oblastí byly inhibovány z 25 %, zelené sněhy z lesních habitatů dosáhly inhibice až z 85 %. Taktéž metanolové extrakty měly větší absorpci UV a modré složky FAR u řas pocházejících z bezlesí (Thomas and Duval, 1995).

## 6.2.2 Intenzita UV záření

Porovná-li podmínky provedeního laboratorního experimentu s podmínkami panujícími v přírodě, tak v průběhu kultivace byly řasy vystaveny UV-A záření po dobu 24 hodin, což je delší časový interval, než s jakým se běžně setkají (s výjimkou polárního dne). Intenzita záření nebyla vyšší ( $0,23 \text{ mW cm}^{-2}$ , tedy  $\sim 8,5 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) v porovnání s hodnotami uváděnými z různých oblastí světa (viz např. Obr. 23). Je třeba vzít také v potaz silnou absorpci UV záření sněhovou pokrývkou (Gorton and Vogelman, 2003, Rivas et al., 2016).

Tabulka 13: Úbytek UV záření a FAR při průchodu sněhovou pokrývkou (Rivas et al., 2016)

	UV-A	UV-B	FAR
hloubka (cm)	$\text{mW cm}^{-2}$ , průměr $\pm$ S.D.		
0	$15.8 \pm 0.97$	$0.35 \pm 0.01$	$163.7 \pm 14.72$
10	$1.31 \pm 0.33$	$0.018 \pm 0.00$	$19.0 \pm 4.12$
20	$0.69 \pm 0.07$	$0.007 \pm 0.00$	$11.5 \pm 1.55$
30	$0.30 \pm 0.01$	$0.002 \pm 0.00$	$6.5 \pm 0.34$



Obr. 23: Intenzita UV-A záření v závislosti na nadmořské výšce v Himalájích. Variabilita v intenzitě UV je dána změnami v oblačnosti v různých dnech měření a časovými odchylkami, kdy jednotlivá měření byla provedena mezi 12 a 15 hodinou. (upraveno podle: [www.melaniewindridge.co.uk](http://www.melaniewindridge.co.uk))

Při měření ve Skalistých horách v Americe se intenzita celkového slunečního záření měnila až desetinásobně v závislosti na oblačnosti (Gorton et al., 2001). V Krkonoších pak byly na povrchu sněhu naměřeny hodnoty UV záření ještě ve větším rozsahu a to mezi  $0,135\text{--}2,27 \text{ m W cm}^{-2}$  (Kvíděrová, 2010). Do důsledku lze říct, že hodnota UV-A záření

v experimentu odpovídala docela dobře hodnotám hlouběji ve sněhu (do 10 cm), kam se řasy běžně schovávají před přílišným ozářením (Tabulka 13) (Rivas et al., 2016). Například druh *Cr. cf. nivalis* se v Krkonoších vyskytoval v hloubce 0–6 cm pod povrchem (Kvíděrová, 2010).

### 6.2.3 Změny $F_v/F_m$ v závislosti na expozici UV záření, životním stádiu a délce laboratorní kultivace

Kmeny jsem měřila relativně čerstvě po přeočkování, kdy se nacházely v aktivních dvoubíčíkatých stádiích s menšími obsahy sekundárních ochranných pigmentů. I přes relativně nízkou intenzitu UV-A záření použitou v experimentu došlo ke značnému snížení hodnot maximálního kvantového výtěžku všech měřených kmenů sněžných řas, a to jak pro kmeny z bezlesých, tak ze zastíněných stanovišť. Kmeny z bezlesých habitatů byly na základě našeho experimentu mírně odolnější k UV-A záření, nicméně i tak došlo k propadu hodnoty jejich maximálního kvantového výtěžku na přibližně 59 % původní hodnoty. U kmenů ze zastíněných lokalit byl pokles ještě o více než 7 % větší. Tyto výsledky naznačují, že kmeny z bezlesých habitatů jsou lépe adaptovány na stres způsobený UV-A zářením. Navíc tento rozdíl mezi stinnými a bezlesými habitaty byl zachován u kmenů, které byly dlouhodobě kultivovány ve v laboratorních podmínkách, což značí, že tyto rozdíly jsou pravděpodobně zakódovány už na genetické úrovni. Pro získání statisticky průkazných rozdílů by bylo patrně potřeba v experimentu použít větší množství kmenů (zejména z lesních stanovišť).

Při experimentech prováděných na ruduchách z brazilského pobřeží se ukázalo, že rozdíl v odolnosti vůči UV záření mezi kmeny z přirozeného prostředí a kmeny kultivovaných v laboratořích přitom může být obrovský. Při kvantitativním srovnání obsahu mykosporinových aminokyselin, které mají silné absorpční vlastnosti v oblasti UV (Shick et al., 1992), byl rozdíl mezi obsahem těchto látek u druhů z rodu *Gracilaria* 150 krát vyšší u vzorků z přirozeného prostředí než u kmene kultivovaného v laboratorních podmínkách (Cardozo et al., 2011).

Hodnoty maximálního kvantového výtěžku již byly publikovány pro některé přírodní populace sněžných řas. Například pro druh *Cr. brevispina* v Krkonoších (0,57). Nicméně řasy byly v tomto případě měřeny až ve fázi oranžových zygospor. Navíc v době měření bylo zataženo a pršelo, tudíž nelze předpokládat, že by řasy byly v čase měření vystaveny stresu indukovanému UV zářením (Kvíděrová et al., 2005). Zatímco při měření starších kultur jsem běžně zaznamenala spíše nižší hodnoty  $F_v/F_m$ , u čerstvě přeočkováného kmene *Cr. brevispina*

bylo  $F_v/F_m$  0,75 a na 0,45 se snížilo až z důvodu vystavení kmene 24 h UV-A záření. Pro vegetativní buňky *Cr. cf. nivalis* zaznamenala Kvíderová (2010) hodnoty v terénu v rozmezí 0,48–0,62, což indikovalo mírný stres těchto buněk. Hodnoty  $F_v/F_m$  pro kmen *Cr. nivalis* (9-b) měřený v rámci této práce se pohybovaly v podobném rozmezí (0,66 na začátku experimentu a 0,40 po vystavení UV-A záření). Tyto kmeny jsou však pravděpodobně přes podobný habitat a morfologii geneticky odlišné, dokonce se s velkou pravděpodobností nejedná ani o tentýž druh (L. Nedbalová, os. sdělení). U komplexu *Cr. nivalis* byly nedávno provedeny analýzy DNA, které naznačují, že jako *Cr. nivalis* by se měl nadále označovat pouze kmen původem z Ameriky (kmen UTEX SNO71), zatímco dalších kmeny dříve považované za *Cr. nivalis* byly popsány jako nové druhy *Cr. hoshawii* sp. a *Cr. remiasii* (Matsuzaki et al., 2018).

Zdá se, že v terénu mají sněžné řasy obvykle mírně snížené hodnoty maximálního kvantového výtežku oproti optimu (např. Stibal et al., 2007). Laboratorní kultury použité v této práci byly tedy s průměrnou hodnotou kolem 0,7 na začátku experimentu ve srovnání s terénními populacemi relativně ve velmi dobré kondici.

Po 24 hodinách působení UV-A průměrná hodnota  $F_v/F_m$  klesla v případě kmenů z bezlesí na 0,41 a u kmenů ze zastíněných lokalit na 0,37. Tento výrazný pokles indikující stres buněk může souviset s tím, že tyto výsledky byly získány na základě měření vegetativních buněk, které na rozdíl od cyst nemají vysokou úroveň ochrany proti následkům vysokých intenzit slunečního záření (Gorton and Vogelmann, 2003). Bylo však zjištěno, že i řasy s nižším obsahem sekundárních karotenoidů, jako je například *Cr. alpina* či *Cr. nivalis*, případně mladá a ne plně ochrannými pigmenty vybavená stadia řas tvořících červené sněhy při měření v terénu nevykazovala znaky poškození při ozáření přirozenou intenzitou v UV spektru (Holzinger and Lütz, 2006). Jak už bylo zmíněno, v přirozeném prostředí se sněžné řasy vyskytují často ve vrstvách několik centimetrů pod povrchem sběhu, kde je intenzita záření radikálně snižena (Gorton and Vogelmann, 2003). K odolnosti přírodních populací nepochybně přispívá fakt, že zatímco kmeny v přírodě jsou aklimované a mají množství pigmentů přizpůsobené aktuálnímu záření včetně zastoupení UV spektra. Řasy kultivované v laboratoři byly vystaveny UV jen v rámci experimentu. Bylo by tedy zajímavé zjistit, zda při kultivaci v laboratorních podmínkách doopravdy dochází k oslabení některých fotoprotektivních mechanismů.

To o kolik je UV-B agresivnější než UV-A záření bylo otestováno na antarktickém kmenu řasy vyizolované ze sněhu (jak již bylo zmíněno, patrně chybně označené jako



*Chlorella* sp.), která byla vystavena 12 h pouze UV-A záření a taktéž UV-B a současně UV-A záření. V případě vystavení pouze UV-A hodnoty klesly  $F_v/F_m$  jen o 5,8 %, zatímco v případě kombinace UV-A a UV-B byl pokles 15,8 % (Rivas et al., 2016). To naznačuje velkou odolnost tohoto kmene vůči UV záření ve srovnání s námi testovanými sněžnými řasami, nicméně je třeba vzít v potaz, že doba expozice UV záření byla pouze poloviční.

Každopádně bez ohledu na to, jestli se u kmenů řas dlouhodobou kultivací snížila či nesnížila jejich odolnost vůči UV-A záření, výsledky ukazují, že jejich schopnost rekonvalescence zůstala zachována. Již po 24 h se kmeny z bezlesých i zastíněných habitatů dostaly na v průměru 89 % hodnoty  $F_v/F_m$ , která byla naměřená na začátku experimentu. Byť kmeny z bezlesých habitatů mají nejspíše efektivnější mechanismy obrany, čemuž nasvědčuje už práce z pohoří Sierra Nevada (Thomas and Duval, 1995), byla rychlost rekonvalescence u kmenů z obou typů habitatů srovnatelná.

Je však třeba také zmínit, že vzhledem k tomu, že rekonvalescence dosáhla u některých řas své maximální hodnoty, nelze z mých výsledků jednoznačně určit, zda mezi kmeny ze zastíněných a bezlesých habitatů opravdu není v efektivitě rekonvalescence rozdíl. Proto by do budoucna bylo zajímavé provést podobný experiment, v rámci kterého by docházelo k měření dat v kratších časových (například hodinových) intervalech v průběhu rekonvalescence, aby se zachytil její detailní průběh. Podobně, jako například v práci z roku 2003, kde sledovali průběh změn způsobených vystavením UV záření na skupině mořských ruduch (Pope et al., 2003).

Pokud srovnám své výsledky testování rekonvalescence s daty naměřenými jinými týmy, naznačují tyto výsledky vesměs dobrou efektivitu rekonvalescence po krátkodobé expozici UV záření u různých skupin. Například u ruduchy *Palmaria decipiens* se řasy dostaly do původního stavu již po 23 h a to byly původně vystaveny i agresivnějšímu UV-B záření, na druhou stranu třeba u druhu *Phycodrys austrogeorgica* bylo ještě po 24 h mikroskopicky viditelné znatelné poškození struktur (Pope et al., 2003). V již zmiňované práci Rivas et al. (2016), se zelené řasy vyizolované ze sněhu zotavily po 12 hodinách na 80–100 % hodnoty  $F_v/F_m$  naměřené před expozicí UV-A a UV-A + UV-B záření.

## 7 Závěr

Cílem této práce bylo srovnat vliv různých intenzit FAR a UV-A záření na kmeny sněžných řas ze dvou typů habitatů a případný vliv dlouhodobé kultivace na tyto kmeny. Testovala jsem fotosyntetické parametry  $\alpha$  a  $I_k$  dlouhodobě kultivovaných kmenů řas, abych určila, jestli si řasy v laboratorních podmínkách zachovávají znaky, které odrážejí podmínky původního prostředí. Podle očekávání se ukázalo, že řasy původem z lesních zastíněných habitatů mají signifikantně vyšší hodnotu  $\alpha$ , tedy efektivnější fotosyntézu za nízkých intenzit FAR než kmeny z exponovaných bezlesých lokalit. Dále mé výsledky naznačují, že u těchto řas dochází k nasycení PSII za nižších intenzit FAR. To je pravděpodobně dáno tím, že se tyto organismy v přírodních podmínkách nesetkávají s extrémně vysokými intenzitami FAR a nejsou na ně tedy adaptovány.

Výsledky mé práce tedy ukazují, že i po mnohaleté laboratorní kultivaci zůstává zachován vliv původního habitatu. Bylo též možné přímo otestovat, zda se fotosyntetické parametry sněžných řas založené na měření RLC křivek mění v průběhu kultivace. Mé výsledky ukazují, že v průběhu tří let mezi měřeními stejných kmenů k signifikantnímu posunu fotosyntetických charakteristik nedošlo a dlouhodobě kultivované laboratorní kmeny lze tedy považovat za poměrně fenotypově stabilní.

Expozice UV-A záření měla na kondici kmenů z obou habitatů značně negativní efekt, který se projevil jako výrazný pokles hodnot maximálního kvantového výtěžku. To mohlo být způsobeno poměrně dlouhou dobou expozice, vlivem předchozí dlouhodobé laboratorní kultivace a absence možnosti bránit se například přesunem do hlubších vrstev sněhu nebo také nedostatečná připravenost fotoprotektivních systémů. Pro ověření poslední možnosti by bylo vhodné experiment do budoucna zopakovat a jako referenční linie několik kmenů mírně aklimatizovat na UV-A před zahájením experimentu. Následná rekonvalescence byla však u všech kmenů efektivní. Dále moje data odpovídají předpokladu, že řasy z bezlesých habitatů jsou odolnější vůči UV-A záření než řasy ze zastíněných lokalit.

## 8 Literární zdroje

- Aalderik, R.H., and Jovin, R. (1997). Estimation of the photosynthesis/irradiance (P/I) curve parameters from light and dark bottle experiments. *J. Plankton Res.* 11, 1713–1742.
- Andersen, R.A. (2005). Freshwater Culture Media. In: *Algal culturing techniques*. Academic Press, P.15, 578 p.
- Aro, E.-M., Virgin, I., and Andersson, B. (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta BBA – Bioenerg.* 1143, 113–134.
- Bidigare, R., Ondrusek, M., Kennicutt, M., Iturriaga, R., Harvey, H., Hoham, R., and Macko, S. (1993). Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. *J. Phycol.* 29, 427–434.
- Bischoff, H.W., and Bold, H.C. (1963). Some soil algae from Enchanted Rock and related algal species Austin, Tex.: University of Texas, 1–95.
- Blumthaler, M., Webb, A.R., Seckmeyer, G., Bais, A.F., Huber, M., and Mayer, B. (1994). Simultaneous spectroradiometry: A study of solar UV irradiance at two altitudes. *Geophys. Res. Lett.* 21, 2805–2808.
- Cardozo, K.H.M., Marques, L.G., Carvalho, V.M., Carignan, M.O., Pinto, E., Marinho-Soriano, E., and Colepicolo, P. (2011). Analyses of photoprotective compounds in red algae from the Brazilian coast. *Rev. Bras. Farmacogn.* 21, 202–208.
- Chalker, B.E. (1980). Modelling light saturation curves for photosynthesis: An exponential function. *Journal of Theoretical Biology* 84, 205–215.
- Clarke, F.C. (1875). Red snow. *Am. Nat.* 1875, 129–135.
- Colbeck, S. (1983). Theory of metamorphism of dry snow. *J. Geophys. Res. - Oceans* 88, 5475–5482.
- Cruz, S., and Serôdio, J. (2008). Relationship of rapid light curves of variable fluorescence to photoacclimation and non-photochemical quenching in a benthic diatom. *Aquat. Bot.* 88, 256–264.
- Day, J.G., and Fleck, R.A. (2015). Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of micro-algae. *Microalgae Biotechnol.* 1–11.
- Day, J.G., Watanabe, M.M., Morris, G.J., Fleck, R.A., and McLellan, M.R. (1997). Long-term viability of preserved eukaryotic algae. *J. Appl. Phycol.* 9, 121–127.
- Demmig-Adams, B., and Adams, W.W. (2003). Photosynthesis and partitioning, Photoinhibition. In B. Thomas, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*, ed. Oxford: Elsevier, pp. 707–714.
- Dove, A., Heldmann, J., McKay, C., and Toon, O.B. (2012). Physics of a thick seasonal snowpack with possible implications for snow algae. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 44, 36–49.
- Duval, B., Shetty, K., and Thomas, W.H. (1999). Phenolic compounds and antioxidant properties in the snow alga *Chlamydomonas nivalis* after exposure to UV light. *J. Appl. Phycol.* 11, 559 p.
- Ettl, H. (1983) Chlorophyta I. Phytomonadina. In: Ettl H, Gerloff J, Heynig H, Mollenhauer D., *Süßwasserflora von Mitteleuropa*, vol. 9. Gustav Fischer, Stuttgart, 807 p.
- Figuerola, F.L., Conde-Alvarez, R., and Gómez, I. (2003). Relations between electron transport rates determined by pulse amplitude modulated chlorophyll fluorescence and oxygen evolution in macroalgae under different light conditions. *Photosynth. Res.* 75, 259–275.
- Garcia-Pichel, F., and Castenholz, R.W. (1991). Characterization and biological implications of scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment1. *J. Phycol.* 27, 395–409.

- Gorton, H.L., and Vogelmann, T.C. (2003). Ultraviolet radiation and the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochem. Photobiol.* 77, 608–615.
- Gorton, H.L., Williams, W.E., and Vogelmann, T.C. (2001). The light environment and cellular optics of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille. *Photochem. Photobiol.* 73, 611–620.
- Häder, D.-P., and Sinha, R.P. (2005). Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. *Mutat. Res.* 571, 221–233.
- Hoham R.W. (1980). Unicellular chlorophytes – snow algae. In: Cox ER., *Phytoflagellates*. Elsevier North Holland: New York; pp. 61–84.
- Hoham, R.W., Marcarelli, A.M., Rogers, H.S., Ragan, M.D., Petre, B.M., Ungerer, M.D., Barnes, J.M., and Francis, D.O. (2000). The importance of light and photoperiod in sexual reproduction and geographical distribution in the green snow alga, *Chloromonas* sp.-D (Chlorophyceae, Volvocales). *Hydrol. Process.* 14, 3309–3321.
- Hoham R.W. and, Duval B. (2001) Microbial ecology of snow and freshwater ice with emphasis on snow algae. In: *Snow ecology: an interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems*. Jones HG, Pomeroy J.W., Walker D.A., Hoham R.W., Cambridge University Press, Cambridge, pp 168–228.
- Hoham, R.W., Berman, J.D., Rogers, H.S., Felio, J.H., Ryba, J.B., and Miller, P.R. (2006). Two new species of green snow algae from Upstate New York, *Chloromonas chenangoensis* sp. nov. and *Chloromonas tughillensis* sp. nov. (Volvocales, Chlorophyceae) and the effects of light on their life cycle development. *Phycologia* 45, 319–330.
- Holzinger, A., and Lütz, C. (2006). Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. *Micron Oxf. Engl.* 1993 37, 190–207.
- Jones, H.G. (1991). Snow chemistry and biological activity: a particular perspective on nutrient cycling. In *Seasonal Snowpacks*, Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 173–228.
- Kawecka, B., Drake, BG. (1978) 1. The sexual reproduction of *Chlamydomonas nivalis* (Bauer) Wille (Chlorophyta, Volvocales). In: *Biology and ecology of snow algae*. *Acta Hydrobiol* 20: 111–116.
- Kawecka, B. (1985). 3. sexual reproduction in *Chloromonas rostafinski* chlorophyta volvocales. In: *Biology and ecology of snow algae*. *Acta Hydrobiologica* 25-26(3-4): 281-286
- Kohshima, S., Yoshimura, Y., Seko, K., and Ohata, T. (1994). Albedo reduction by biotic impurities on a perennial snow patch in the Japan Alps. In: Jones H.G., Davies T.D., Ohmura A., and Morris E.M., *Snow and ice covers: Interactions with the atmosphere and ecosystems*, Wallingford: Int Assoc Hydrological Sciences, pp. 323–330.
- Komárek, J., and Nedbalová, L. (2007) Green cryoctic algae. In: Seckbach, J. (ed.): *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. Springer, Dordrecht, pp. 323–338.
- Kvídiová, J. (2010). Characterization of the community of snow algae and their photochemical performance in situ in the Giant Mountains, Czech Republic. *Arct. Antarct. Alp. Res.* 42, 210–218.
- Kvídiová, J., Stibal, M., Nedbalová, L., and Kaštovská, K. (2005). The first record of snow algae vitality in situ by variable fluorescence of chlorophyll. *Fototea* 5, 69–77.
- Lagorio, M.G., Cordon, G.B., and Iriel, A. (2015). Reviewing the relevance of fluorescence in biological systems. *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 14, 1538–1559.
- Lakeman, M.B., Dassow, P. von, and Cattolico, R.A. (2009). The strain concept in phytoplankton ecology. *Harmful Algae* 8, 746–758.

- Laybourn-Parry, J., Tranter, M., and Hodson, A.J. (2012). The ecology of snow and ice environments. Oxford University Press. New York, 179 p.
- Leya, T. (2013) Snow algae: Adaptation strategies to survive on snow and ice. In: Polyextremophiles – Life under multiple forms of stress, Springer, Dordrecht, pp. 401–423.
- Ling, H.U. (1996). 10. Snow algae of the Windmill Islands region, Antarctica. *Hydrobiologia* 336, 99–106.
- Lütz-Meindl, U., and Lütz, C. (2006). Analysis of element accumulation in cell wall attached and intracellular particles of snow algae by EELS and ESI. *Micron Oxf. Engl.* 1993 37, 452–458.
- Matsuzaki, R., Hara, Y., and Nozaki, H. (2012). A taxonomic revision of *Chloromonas reticulata* (Volvocales, Chlorophyceae), the type species of the genus *Chloromonas*, based on multigene phylogeny and comparative light and electron microscopy. *Phycologia* 51, 74–85.
- Matsuzaki, R., Nozaki, H., and Kawachi, M. (2018). Taxonomic revision of *Chloromonas nivalis* (Volvocales, Chlorophyceae) strains, with the new description of two snow-inhabiting *Chloromonas* species. *PLoS ONE* 13. 1–17
- Morgan-Kiss, R.M., Priscu, J.C., Pocock, T., Gudynaite-Savitch, L., and Huner, N.P.A. (2006). Adaptation and acclimation of photosynthetic microorganisms to permanently cold environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 222–+.
- Muller, J., Friedl, T., Hepperle, D., Lorenz, M., and Day, J.G. (2005). Distinction between multiple isolates of *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae) and testing for conspecificity using amplified fragment length polymorphism and its rDNA sequences. *J. Phycol.* 41, 1236–1247.
- Murchie, E.H., and Lawson, T. (2013). Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J. Exp. Bot.* 64, 3983–3998.
- Nedbalová, L., Kociánová, M., and Lukavský, J. (2008). Ecology of snow algae in the Giant Mts. *Opera Corcon.* 45, 59–68.
- Nielsen, E.S., and Jørgensen, E.G. (1968). The adaptation of plankton algae. *Physiol. Plant.* 21, 401–413.
- Palm, E., and Tveitereid, M. (1979). On heat and mass flux through dry snow. *J. Geophys. Res.* 84, 745.
- Pichrtová, M., Remias, D., Lewis, L.A., and Holzinger, A. (2013). Changes in phenolic compounds and cellular ultrastructure of Arctic and Antarctic strains of *Zygnema* (Zygnematophyceae, Streptophyta) after exposure to experimentally enhanced UV to PAR Ratio. *Microb. Ecol.* 65, 68–83.
- Pomeroy and Brun (2001) Physical Properties of Snow In: Jones HG, Pomeroy JW, Walker DA, Hoham RW (eds) *Snow ecology: an interdisciplinary examination of snow-covered ecosystems*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 45-118.
- Poppe, F., Schmidt, R.A.M., Hanelt, D., and Wiencke, C. (2003). pEffects of UV radiation on the ultrastructure of several red algae. *Phycol. Res.* 51, 11–19.
- Procházková, L., Remias, D., Řezanka, T., and Nedbalová, L. (2018a). *Chloromonas nivalis* subsp. *tatrae*, subsp. nov. (Chlamydomonadales, Chlorophyta): re-examination of a snow alga from the High Tatra Mountains (Slovakia). *Fottea* 18, 1–18.
- Procházková, L., Remias, D., Holzinger, A., Řezanka, T., and Nedbalová, L. (2018b). Ecophysiological and morphological comparison of two populations of *Chlainomonas* sp. (Chlorophyta) causing red snow on ice-covered lakes in the High Tatras and Austrian Alps. *Eur. J. Phycol.* 53, 230–243.

- Pröschold, T., Marin, B., Schlösser, U.G., and Melkonian, M. (2001). Molecular phylogeny and taxonomic revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas ehrenberg* and *Chloromonas gobi*, and Description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. Nov, Protist 152, 265–300.
- Ralph, P.J., and Gademann, R. (2005). Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. Aquat. Bot. 82, 222–237.
- Remias, D., Lutz-Meindl, U., and Lutz, C. (2005). Photosynthesis, pigments and ultrastructure of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis*. Eur. J. Phycol. 40, 259–268.
- Remias, D., Karsten, U., Lütz, C., and Leya, T. (2010a). Physiological and morphological processes in the Alpine snow alga *Chloromonas nivalis* (Chlorophyceae) during cyst formation. Protoplasma 243, 73–86.
- Remias, D., Albert, A., and Lütz, C. (2010b). Effects of realistically simulated, elevated UV irradiation on photosynthesis and pigment composition of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis* and the arctic soil alga *Tetracystis* sp. (Chlorophyceae). Photosynthetica 48, 269–277.
- Remias, D., Schwaiger, S., Aigner, S., Leya, T., Stuppner, H., and Luetz, C. (2012). Characterization of an UV – and VIS-absorbing, purpurogallin-derived secondary pigment new to algae and highly abundant in *Mesotaenium berggrenii* (Zygnematophyceae, Chlorophyta), an extremophyte living on glaciers. FEMS Microbiol. Ecol. 79, 638–648.
- Rivas, C., Navarro, N., Huovinen, P., and Gómez, I. (2016). Photosynthetic UV stress tolerance of the Antarctic snow alga *Chlorella* sp. modified by enhanced temperature. Rev. Chil. Hist. Nat. 89, 7 p.
- Seckbach, J. (2007). Algae and cyanobacteria in extreme environments, Springer, Netherlands, 813 p.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., and Pessarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions.
- Shick, J.M., Dunlap, W.C., Chalker, B.E., Banaszak, A.T., and Rosenzweig, T.K. (1992). Survey of ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in organs of coral reef holothuroids. Mar. Ecol. Prog. Ser. 90, 139–148.
- Smith, R.C., Prezelin, B.B., Baker, K.S., Bidigare, R.R., Boucher, N.P., Coley, T., Karentz, D., MacIntyre, S., Matlick, H.A., Menzies, D., et al. (1992). Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in antarctic waters. Science 255, 952–959.
- Stibal, M., Elster, J., Šabacká, M., and Kaštovská, K. (2007). Seasonal and diel changes in photosynthetic activity of the snow alga *Chlamydomonas nivalis* (Chlorophyceae) from Svalbard determined by pulse amplitude modulation fluorometry. FEMS Microbiol. Ecol. 59, 265–273.
- Strasser, R., Srivastava, A., and Tsimilli-Michael, M. (2000). The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. Probing Photosynth. Mech. Regul. Adapt. 444–483
- Thomas, D.N., and Dieckmann, G.S. (2002). Ocean science – Antarctic sea ice – a habitat for extremophiles. Science 295, 641–644.
- Thomas, W.H., and Duval, B. (1995). Sierra Nevada, California, U.S.A., Snow Algae: Snow albedo changes, algal-bacterial interrelationships, and ultraviolet radiation effects. Arct. Alp. Res. 27, 389–399.
- Thorington, L. (1980). Actinic effects of light and biological implications. Photochem. Photobiol. 32, 117–129.
- Turnbull, T.L., Barlow, A.M., and Adams, M.A. (2013). Photosynthetic benefits of ultraviolet-A to *Pimelea ligustrina*, a woody shrub of sub-alpine Australia. Oecologia 173, 375–385.

- Tyrrell, R.M. (1985). A common pathway for protection of bacteria against damage by solar UVA (334 nm, 365 nm) and an oxidising agent (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). *Mutat. Res.* 145, 129–136.
- Undurraga, D., Poirrier, P., and Chamy, R. (2016). Microalgae growth kinetic model based on the PSII quantum yield and its utilization in the operational curves construction. *Algal Res.* 17, 330–340.
- Vincent, W.F., and Roy, S. (1993). Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environ. Rev.* 1, 1–12.
- Walsby, A.E. (1997): Modelling the daily integral of photosynthesis by phytoplankton: its dependence on the mean depth of the population. – *Hydrobiologia* 349, 65–74.
- Wang, Q., Hou, Y., Miao, J., and Li, G. (2009). Effect of UV-B radiation on the growth and antioxidant enzymes of Antarctic sea ice microalgae *Chlamydomonas* sp ICE-L. *Acta Physiol. Plant.* 31, 1097–1102.
- Webb, W.L.; Newton, M. & Starr, D. (1974): Carbon dioxide exchange of *Alnus rubra*. A mathematical model. – *Oecologia* 17: 281–291.
- Weiss, R.L. (1983). Fine structure of the snow alga (*Chlamydomonas nivalis*) and associated bacterial. *J. Phycol.* 19, 200–204.
- Wiscombe, W.J., and Warren, S.G. (1980). A model for the spectral albedo of snow. I: Pure snow. *J. Atmospheric Sci.* 37, 2712–2733.
- Xiong, F., Komenda, J., Kopecký, J., and Nedbal, L. (1997). Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiol. Plant.* 100, 378–388.
- Yamamoto, Y. (2016). Quality control of photosystem II: The mechanisms for avoidance and tolerance of light and heat stresses are closely linked to membrane fluidity of the thylakoids. *Front. Plant Sci.* 7, 1–13
- Yallop, M.L., Anesio, A.M., Perkins, R.G., Cook, J., Telling, J., Fagan, D., MacFarlane, J., Stibal, M., Barker, G., Bellas, C., et al. (2012). Photophysiology and albedo-changing potential of the ice algal community on the surface of the Greenland ice sheet. *ISME J.* 6, 2302–2313.

### Internetové zdroje:

- Botanický ústav AV ČR, v. v. i. – Měření indukované fluorescence chlorofylu [vid. 4. 11. 2018] Dostupné z: <http://www.ibot.cas.cz/cs/vedecke-skupiny-a-laboratore/oddeleni-experimentalni-fykologie-a-ekotoxikologie6/laboratore/fluorescence/indukovana-fluorescence-chlorofylu/>
- Countryliving – Pink 'Watermelon' Snow Is a Thing—But You Definitely Do Not Want to Eat It [vid. 5.9.2018] Dostupné z: <https://www.countryliving.com/life/a16177217/pink-watermelon-snow/>
- Culture Collection CCCryo of Cryophilic Algae [vid. 10. 3. 2019] Dostupné z: <http://cccryo.fraunhofer.de/web/infos/welcome/>
- Dr. Melanie Windridge – Ultraviolet radiation at altitude [vid. 29. 3. 2019] Dostupné z: <http://melaniewindridge.co.uk/mountain-science/mountain-science-preliminary-results-3.html>
- Photoinhibition and PSII repair cycle.jpg EsaTyystjärvi 2009 [vid. 2. 7. 2018] Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Photoinhibition\\_and\\_PSII\\_repair\\_cycle.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Photoinhibition_and_PSII_repair_cycle.jpg)
- How to analyze a rapid light cuve – a guide [vid. 15.7.2018] Dostupné z: <https://aquation.com.au/wp-content/uploads/2017/08/How-to-Analyse-a-Rapid-Light-Curve.pdf>

- Oulun Yliopisto – The winter of our northern nature [vid. 8. 8. 2018] Dostupné z:  
<https://www.oulu.fi/northernnature/english/englanti/talvikansio/talviymp3en.html>
- Plantimals – PAM Fluorometry [vid. 4. 9. 2018] Dostupné z:  
<https://sites.tufts.edu/photosyntheticanimals/pam-fluorometry/>
- Photon System Instruments – FluorCams [vid. 4.9.2018] Dostupné z: <http://psi.cz/products/fluorcams/>
- Slideplayer – Presentation on theme: „Snow algae and their relevance to astrobiology“ – Ph.D. Jana Kvíderová [vid. 28. 2. 2019] Dostupné z: <https://slideplayer.com/slide/8402458/>
- Snow-algae.com – Exploring snow algae, Green and red life cycle [vid. 18. 11. 2018] Dostupné z:  
<http://www.snow-algae.com/exploring-snow-algae/green-and-red-life-cycle.html>
- TL Mini Blacklight Blue – TL 8W BLB 1FM [vid. 6. 12. 2018] Dostupné z:  
[http://www.lighting.philips.cz/prof/konvenncni-svetelne-zdroje-a-trubice/specialni-svetelne-zdroje/barevne-a-blacklight-blue-blb/tl-mini-blacklight-blue/928001010803\\_EU/product](http://www.lighting.philips.cz/prof/konvenncni-svetelne-zdroje-a-trubice/specialni-svetelne-zdroje/barevne-a-blacklight-blue-blb/tl-mini-blacklight-blue/928001010803_EU/product)
- UTEX Culture Collection of Algae at The University of Texas at Austin – *Chloromonas brevispina* [vid. 10. 8. 2018] Dostupné z:  
[https://utex.org/pages/search-results?q=chloromonas%20brevispina&page\\_num=2](https://utex.org/pages/search-results?q=chloromonas%20brevispina&page_num=2)